



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
Main Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2016

Charakterisierung haemophiler Bakterienisolate der Gattungen Histophilus und Haemophilus aus Wiederkäuern

Sutter, Gabriella

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich
ZORA URL: <http://doi.org/10.5167/uzh-130498>

Originally published at:

Sutter, Gabriella. Charakterisierung haemophiler Bakterienisolate der Gattungen Histophilus und Haemophilus aus Wiederkäuern. 2016, University of Zurich, Vetsuisse-Fakultät.

Klinik für Reproduktionsmedizin
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Heiner Bollwein

Abteilung für Grosstierreproduktion

Leitung: Prof. Dr. Ulrich Bleul

**Charakterisierung haemophiler Bakterienisolate der Gattungen
Histophilus und *Haemophilus* aus Wiederkäuern**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Gabriella Sutter

Tierärztin

aus Freienstein/ZH

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Ulrich Bleul, Hauptreferent

Prof. Dr. Ludwig E. Hölzle, Korreferent

2016

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	2
1 EINLEITUNG	3
2 LITERATURÜBERSICHT	4
2.1 Allgemeine Eigenschaften	4
2.2 Taxonomie	4
2.3 Mikrobielle Eigenschaften	6
2.4 Genera <i>Haemophilus</i> und <i>Histophilus</i>	7
2.4.1 <i>Histophilus somni</i>	11
2.4.1.1 Eigenschaften, Vorkommen, Verbreitung	12
2.4.1.2 Virulenzfaktoren	13
2.4.1.3 Verursachte Krankheiten	14
2.4.1.4 Diagnose	17
2.4.1.5 Therapie und Prophylaxe	19
2.4.2 <i>Haemophilus parasuis</i>	20
2.4.2.1 Identifizierung, Vorkommen, Verbreitung	20
2.4.2.2 Verursachte Krankheiten	22
2.4.2.3 Virulenzfaktoren	24
2.4.2.4 Diagnose	25
2.4.2.5 Therapie und Prophylaxe	26
2.4.3 <i>Haemophilus influenzae</i>	28
2.4.3.1 Identifizierung, Vorkommen, Verbreitung	28
2.4.3.2 Verursachte Krankheiten	29
2.4.3.3 Virulenzfaktoren	30
2.4.3.4 Diagnose	30
2.4.3.5 Therapie und Prophylaxe	31
3 MATERIAL UND METHODEN	34
3.1 Bakterienisolate	34
3.1.1 Lyophilisate	34
3.1.2 Nährmedien	35
3.2 Mikroskopische Visualisierung: Gram-Färbung	36
3.2.1 Reagenzien und Lösungen	36
3.2.2 Durchführung	36
3.3 Aufarbeitung des Probenmaterials für die PCR	38
3.3.1 DNA-Extraktion mit Phenol/Chloroform	38
3.3.2 Lyse der Bakterien zur DNA-Gewinnung	39
3.4 Polymerase-Kettenreaktion, PCR	39

3.4.1	Lösungen und Reagenzien	39
3.4.2	PCR zur Amplifizierung des 16s rRNA-Gens	39
3.5	Agarose-Gel-Elektrophorese	41
3.5.1	Lösungen und Reagenzien	41
3.5.2	Agarosegel-Elektrophorese	41
3.5.3	Aufreinigung der PCR-Produkte	42
3.5.4	DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte	42
3.6	Testen der Faktorenabhängigkeit	42
3.7	Vermehrung der Bakterien in grösseren Volumina	43
3.8	DNA-Verdau	44
3.9	Southern Blot	45
3.9.1	Puffer, Lösungen und weitere Materialien	45
3.9.2	Durchführung	45
3.10	Hybridisierung	46
3.10.1	Reagenzien und Puffer	46
3.10.2	Nicht-radioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin	46
3.10.3	Hybridisierungsreaktion und –detektion	47
4	ERGEBNISSE	48
4.1	Schematische Darstellung des Untersuchungsgangs	48
4.2	Kulturelle Typisierung der haemophilen Diagnostikisolate	49
4.3	16S rDNA-Typisierung der haemophilen Diagnostikisolate	55
4.4	Ribotypisierung der haemophilen Diagnostikisolate	61
4.5	Gegenüberstellung der Typisierungsergebnisse	62
5	DISKUSSION	63
6	ANHANG	67
A.1	Tabelle aller erprobter Lyophilisate	67
A.2	Literaturverzeichnis	73
A.3	Abbildungsverzeichnis	88
A.4	Tabellenverzeichnis	89
7	CURRICULUM VITAE	

Zusammenfassung

Haemophile Bakterien der Gattungen *Haemophilus* und *Histophilus* sind bei Nutztieren weit verbreitet. Beim Wiederkäuer gilt *Histophilus somni* (syn. *Haemophilus somnus*) als Verursacher der ISTME/TEME, einer fieberhaften Allgemeinerkrankung mit zentralnervösen Erscheinungen. Darüber hinaus werden Endometritiden, Mastitiden, Aborte und die Geburt lebensschwacher Kälber mit *Histophilus somni*-Infektionen in Verbindung gebracht. Gleichzeitig findet man diese Bakterien häufig als asymptomatische Besiedler von Schleimhäuten des Genital- und Respirationstrakts. Nicht jede Infektion führt zu einer klinischen Erkrankung. Deshalb sind epidemiologische Untersuchungen basierend auf molekularen Methoden essentiell, um Aussagen über die Beteiligung von *Histophilus somni* an verschiedenen Bestandserkrankungen machen zu können.

In der vorliegenden Arbeit wurden 194 *Histophilus*/*Haemophilus*-Isolate aus der diagnostischen Stammsammlung des Instituts für Veterinär bakteriologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich aus den Jahren 1974 bis 1998 untersucht. Als Methoden wurden Kultur, 16S rDNA Amplifizierung und Sequenzierung sowie Ribotypisierung verwendet. Kulturell typisiert werden konnten insgesamt 13 Isolate, die alle nicht hämolysierend, Oxidase-positiv und Katalase-negativ waren. Ihr Wachstum war V- und X-Faktor unabhängig. Aufgrund ihrer Koloniemorphologie wurden sechs Isolate der M-Form (mukoid), vier Isolate der S-Form (smooth) und drei Isolate der R-Form (rough) zugeordnet. Die Analyse der 16S rDNA aus 28 haemophilen Isolaten mit Datenbankeinträgen ergab für alle Isolate eine höchste Übereinstimmung mit 16S rDNA-Sequenzen von *Histophilus somni*-Isolaten. Aufgrund der unterschiedlichen Übereinstimmungsraten wurden eine Unterteilung in die drei 16S rDNA-Gruppen A, B und C vorgenommen. Interessanterweise wiesen 13 der 28 untersuchten Isolate (46,4%) eine Übereinstimmung von <95% mit bekannten *Histophilus somni*-Isolaten auf. Ob aufgrund der gefundenen Übereinstimmungsraten eine neue Spezies-Bestimmung zu erfolgen hat, wird Thema zukünftiger Untersuchungen sein. Zudem wurden 13 *Histophilus*/*Haemophilus*-Isolate ribotypisiert. Dabei konnten die Isolate fünf verschiedenen Ribotypen zugeordnet werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten Isolate eine grosse genetische Vielfalt aufwiesen, wie sie auch in der Literatur beschrieben ist.

Summary

Haemophilic bacteria of the genera *Haemophilus* and *Histophilus* are found worldwide in a wide range of animals. In ruminants, *Histophilus somni* (syn. *Haemophilus somnus*) is known as causative agent of ISTME/TEME, a febrile disease with central nervous clinical signs. In addition, endometritis, mastitis, abortion, and birth of weak calves are described to be associated with *Histophilus somni* infections. Simultaneously, asymptomatic carrier animals are described where these bacteria colonize the mucosa of the genital tract and respiratory tract without evoking clinical signs. Thus, epidemiological investigations based on molecular methods are urgently needed to get insights into the significance of *Histophilus somni* infections in cattle breedings and their involvement in disease.

In the present work, 194 *Histophilus*/*Haemophilus* isolates derived from the diagnostic bacterial type collection of the Institute of Veterinary Bacteriology, Vetsuisse Faculty, University Zurich from the years of 1974 to 1998 were investigated. Culture methods, 16S rDNA amplification and sequencing as well as ribotyping were applied. By using culture based methods, 13 isolates did not show hemolysis and were oxidase positive, and catalase negative. The growth of all isolates investigated did not require V or X factors. Based on the colony morphology six isolates were assigned to the M colony type (mucoid), four isolates to the S colony type (smooth), and three isolates to the R colony type. Comparison of the 16S rDNA sequences to databank entries revealed the highest agreement (identity rates) with 16S rDNA sequences of *Histophilus somni* isolates. Based on the sequence differences in the 16S rDNA sequences the *Histophilus* isolates were grouped into the three 16S rDNA groups A, B, and C. Interestingly, the identities of 13 of the 28 isolates (46.4%) with 16S rDNA sequences of published sequences were below 95%. Whether this low agreement rates could be the basis for a new species affiliation should be the goal of future studies. Furthermore, the 13 *Histophilus*/*Haemophilus* isolate were ribotyped into five different groups. In conclusion, the *Haemophilus*/*Histophilus* isolates were found to be highly variable, a fact that was also described in the published literature.

1 Einleitung

Infektionen mit Bakterien der Gattungen *Haemophilus* und *Histophilus* sind in Nutztierbeständen seit sehr langer Zeit bekannt und weltweit verbreitet. Sie verursachen Krankheiten wie die Glässer'sche Krankheit beim Schwein, eine Polyserositis oder die ISTME/TEME beim Rind, eine Meningoencephalitis. Diese Erreger spielen auch bei Erkrankungen des Respirationstrakts z.B. beim Schwein, Rind und Huhn, des Reproduktionsapparats z.B. beim Rind in Form von Endometritiden und Aborten oder des Euters beim Rind und Schaf eine wichtige Rolle. Co-Infektionen mit Viren und Bakterien (Circoviren und PRRSV bzw. Pasteurellen und Bordetellen beim Schwein; Bovines Respiratory Synzytial Virus oder bovines Parainfluenza-3-Virus bzw. Pasteurellen, *Mannheimia* und Mykoplasmen beim Rind) und somit eine Beteiligung an multifaktoriellen und wirtschaftlich bedeutsamen Krankheitskomplexen sind häufig nachweisbar. Daneben findet man aber *Haemophilus* und *Histophilus* bei bis zu 50% der gesunden Nutztiere als Bestandteil der normalen Schleimhaut-Flora.

Nach wie vor ungeklärt bleibt die wichtige Fragestellung, welche Faktoren und Eigenschaften dafür verantwortlich sind, ob Bakterien der Gattungen *Haemophilus* und *Histophilus* als primäre oder fakultativ Pathogene fungieren oder ob sie als Besiedler der Schleimhäute ein Teil der physiologischen Flora sind. Ein wichtiger Schritt zur Aufklärung dieser Frage ist die molekular-epidemiologische Charakterisierung von Isolaten aus Krankheitsfällen und vergleichend dazu von Isolaten aus gesunden Tieren. Für Isolate aus Schweizer Beständen gibt es bisher keine Studien mit einer umfassenden kulturellen und molekularen Typisierung von *Histophilus/Haemophilus*-Isolaten aus klinisch-kranken Tieren und klinisch-gesunden Tieren. Diese Untersuchungen sind aber essentiell für das Verständnis der Epidemiologie von Infektionsverläufen und der Krankheitsverläufe.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Isolate aus der Stammsammlung des Instituts für Veterinärbakteriologie mittels Kultur, 16S rDNA-Sequenzierung und Ribotypisierung einen ersten Überblick über die in der Schweiz vorkommenden *Haemophilus/Histophilus*-Isolate beim Rind zu gewinnen. Zwar ermöglichen kulturelle Charakterisierung und Genotypisierung aufgrund der fehlenden wissenschaftlichen Erkenntnisse momentan keine Rückschlüsse auf Virulenz und Pathogenität von *Haemophilus/Histophilus*-Isolaten, aber sie erlauben zumindest, das Verständnis für die Epidemiologie dieser Erreger zu verbessern.

2 Literaturübersicht

2.1 Allgemeine Eigenschaften

Bei den haemophilen Bakterien handelt es sich um eine Gruppe von stäbchenförmigen, unbeweglichen, gramnegativen Bakterien der Familie der *Pasteurellaceae*, die insbesondere dadurch gekennzeichnet sind, dass ihr Wachstum auf Nährmedien von Wachstumsfaktoren, die im Blut vorkommen, abhängt. Aktuell werden Bakterien der Gattungen *Haemophilus* und *Histophilus* als haemophile Bakterien subsumiert.

2.2 Taxonomie

Die Genera *Haemophilus* und *Histophilus* werden taxonomisch in die Familie *Pasteurellaceae* eingeordnet. Die Familie der *Pasteurellaceae* umfasst 15 Gattungen (Abbildung 1), die Gattung *Haemophilus* besteht insgesamt aus 12 Spezies. Umfangreiche Untersuchungen mittels DNA-DNA-Hybridisierungen, DNA-rRNA-Hybridisierungen, antigener und cytochemischer Analysen und 16S rDNA Sequenzierungen haben eindeutig gezeigt, dass (1.) die ursprünglichen Spezies *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* und *Histophilus ovis* als eine und dieselbe Gattung anzusehen sind, und (2.) die daher neu zu definierende Spezies nicht innerhalb der Gattung *Haemophilus* einzuklassifizieren war [31, 10, 168, 169, 170, 171]. Die aktuelle Taxonomie sieht eine Gattung *Histophilus* vor, die nur eine Spezies (*Histophilus somni*) beinhaltet [9].

Historisch beruht der Gattungsname *Haemophilus* (*gr.* haima: Blut; *gr.* philos: Liebhaber) auf einer Wachstumsabhängigkeit von Blutkomponenten (Faktoren X und V). Tatsächlich galt die Auxotrophie für die Faktoren X (prothetische Gruppe Häm) und/oder V (Nikotin-Adenin-Dinukleotidphosphat; NAD) als Gattungskriterium. Mit Hilfe von DNA-Homologie-Studien wurde die Faktorabhängigkeit als Gattungskriterium jedoch in Frage gestellt und gilt heute nicht mehr [12, 18, 157].

In Abbildung 1 ist die aktuellste Version der Taxonomie der Familie *Pasteurellaceae* aufgeführt.

Familie: *Pasteurellaceae*

Genus I: *Pasteurella*

Genus II: *Actinobacillus*

Genus III: <i>Haemophilus</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
	<i>Haemophilus aegypticus</i>
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
	<i>Haemophilus ducreyi</i>
	<i>Haemophilus haemoglobinophilus</i>
	<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>
	<i>Haemophilus parasuis</i>
	<i>Haemophilus paraphrohaemolyticus</i>
	<i>Haemophilus paracuniculus</i>
	<i>Haemophilus felis</i>
	<i>Haemophilus pittmaniae</i>

Genus IV: *Lonepinella*

Genus V: *Mannheimia*

Genus VI: *Phocoenobacter*

Genus VII: *Gallibacterium*

Genus VIII: <i>Histophilus</i>	<i>Histophilus somni</i>
---------------------------------------	--------------------------

Genus IX: *Volucribacter*

Genus X: *Avibacterium*

Genus XI: *Nicoletella*

Genus XII: *Aggregatibacter*

Genus XIII: *Bibersteinia*

Genus XIV: *Chelonobacter*

Genus XV: *Basfia*

Abbildung 1: Taxonomie, basierend auf ICSP Subcommittee on the Taxonomy of *Pasteurellaceae*
- December 2009 (Henrik Christensen; <http://www.the-icsp.org/taxa/Pasteurellaceaelist.htm>)

2.3 Mikrobielle Eigenschaften

Bei der Familie der *Pasteurellaceae* handelt es sich um gramnegative, kokkoide bis stäbchenförmige, unbewegliche, nicht sporenbildende Bakterien, die Oxidase- und Katalase-positiv sind. Sie sind fakultativ anaerob und gewinnen ihre Energie sowohl durch Fermentation unter anaeroben Bedingungen als auch über oxidative Vorgänge (Atmungsprozess unter aeroben Bedingungen). Die optimalen Wachstumsbedingungen für *Haemophilus/Histophilus* spp. liegen bei 5-10% CO₂ und einer Temperatur von 35-37°C (167).

Gefunden werden diese Bakterien vor allem auf Schleimhäuten des Respirationstraktes, des Verdauungs- und Geschlechtsapparates von Säugetieren, Vögeln, Reptilien und Menschen [1, 112, 113, 114]. Wegen ihrer guten Anpassung an die parasitäre Lebensweise stellen Vertreter der Familie *Pasteurellaceae* grosse Ansprüche an Nährmedien und weisen nur eine geringe Tenazität ausserhalb des Wirtes auf [6, 37].

In dieser Familie finden wir sowohl apathogene Schleimhautbewohner (Kommensale) als auch Erreger primärer Tierseuchen, die grosse wirtschaftliche Verluste verursachen können [1]. Vertreter der Familie der *Pasteurellaceae* verursachen nicht nur Krankheiten beim Tier, sondern treten auch beim Menschen als Infektionserreger auf [115, 116, 117]. *H. influenzae* besiedelt beispielsweise als Teil der Normalflora die Schleimhaut des menschlichen Respirationstraktes und kann je nach Virulenz des Isolates und der Abwehrlage des Wirtes zu Krankheiten wie Pneumonie, Meningitis oder Sepsis führen [112, 113, 114, 115, 116, 117].

Im Weiteren werden die Genera *Haemophilus/Histophilus* mit den Vertretern *Histophilus somni*, *H. parasuis* und *H. influenzae* als Krankheitserreger beim Tier und Mensch behandelt.

2.4 Genera *Haemophilus* und *Histophilus*

Die erste *Haemophilus*-Art wurde 1892 von Richard Pfeiffer als vermeintlicher Influenza-Erreger unter dem Namen *Haemophilus influenzae* beschrieben [88, 89]. In Tabelle 1 sind die wichtigsten *Haemophilus/Histophilus* Spezies und die dazugehörigen Krankheitsbilder zusammengefasst.

Spezies	Wirt	Krankheit	Symptome	Bedeutung
<i>H. parasuis</i>	Schwein	Glässer'sche Krankheit (Polyserositis, Perikarditis, Arthritis, Meningitis), Pneumonie, Septikämie [20]	Lahmheiten bis Festliegen, hochgradige Bewegungsunlust, steifer Gang (Polyarthritis und Meningitis), Husten, Atemnot (Pleuritis und Pneumonie) sowie hohes Fieber (Septikämie) [24]	Wirtschaftl. Verluste [20]
<i>H. paracuniculus</i>	Kaninchen	Mukoide Enteritis [142]	Dehydratation, Durchfall, Hypothermie [142, 152]	50% Mortalität bei Jungtieren [152]
<i>H. paragallinarum</i> (syn. <i>Avibacterium paragallinarum</i>)	Huhn	Erkrankungen des oberen Respirationstraktes („Hühnerschnupfen“)[147, 148]	Nasenausfluss, niessen, Schwellung des Gesichtes [147, 148]	Rückgang der Eiprod., Gewichtsverlust, Kümmerer [147, 148]
<i>Histophilus somni</i>	Rind	ISTME/TEME, Abort, Endometritis, Infektionen des Respirationstraktes, Mastitis, Myokarditis [26, 146]	Je nach Krankheitsbild von neurologischen Ausfallerscheinungen bis hin zu respiratorischen Symptomen [26, 146]	Keine befriedigenden Präventionsmassnahmen vorhanden, sofortige antibiotische Therapie-massnahmen bei Ausbruch notwendig [92], Impfung vor Infektion [93, 94, 95, 96,]
<i>Histophilus somni</i> [syn. <i>Histophilus ovis</i> / <i>H. agni</i>]	Schaf	Mastitis [143], Nebenhodenentzündung, Synovitis, Septikämie [144, 145]	Je nach Krankheit sehr variabel [143, 144, 145]	

Tabelle 1: *Haemophilus/Histophilus* Spezies und verursachte Krankheiten

Die Vertreter der Gattungen *Haemophilus* und *Histophilus* sind, wie oben für die gesamte Familie *Pasteurellaceae* beschrieben, kleine, unbewegliche, gramnegative, kokkoide bis stäbchenförmige Bakterien. Sie sind fakultativ anaerob und erscheinen oft in pleomorpher Form [156]. Ihre Tenazität in der Umwelt ist gering, so sind sie empfindlich gegen Sonnenlicht und Austrocknung und sie werden durch übliche Desinfektionsmittel abgetötet [6]. Viele von ihnen bilden polysaccharidhaltige Kapseln, die für die serologische Differenzierung von Nutzen sind. Als gramnegative Bakterien besitzen *Haemophilus/Histophilus* spp. ein Lipopolysaccharid (LPS), das aber im Gegensatz zum LPS anderer gramnegativer Bakterien nur kurze O-Seitenketten aufweist und deshalb als Lipooligosaccharid (LOS) bezeichnet wird [172].

Verschiedene Virulenzfaktoren sind für die haemophilen Bakterien beschrieben. Das Habitat, nämlich die Schleimhäute verschiedener Organsysteme wie z.B. im Atmungsapparat, Verdauungs- und Geschlechtstrakt erfordert spezielle Mechanismen für die Anheftung an die Zellen (Adhäsionsfaktoren). Verschiedene Adhäsions-assoziierte Faktoren wurden bislang beschrieben. So ist für das LOS bekannt, dass es neben seiner Funktion als Endotoxin auch an der Adhäsion an Epithel- und Endothelzellen beteiligt ist [173]. Zudem wurden für *H. influenzae* die hochmolekularen Rezeptorproteine 1 und 2 (high molecular weight protein 125 kDa-HMW1 und 120 kDa-HMW2) als Adhäsine beschrieben [174, 175, 176, 184]. HMW1/2 sind aussen auf der Bakterienzelle lokalisiert, besitzen einen Membrananker und gehören zu einer Autotransporterfamilie [177]. HMW 1 bindet insbesondere an Epithelzellen im Nasen-Rachenraum, während HMW2 v.a. die Adhäsion an Epithelzellen des Genitaltrakts vermittelt [178]. Aber auch die Membranproteine P2 und P5 von *H. influenzae*, sowie Fimbrien-ähnliche Proteine von *H. parasuis* weisen adhäsive Eigenschaften auf [179, 180, 181]. Weiterhin dient die aus Polysacchariden aufgebaute Kapsel bei manchen haemophilen Bakterienarten als Adhäsions- und Virulenzfaktor. Sie wirkt antiphagozytotisch, also als Schutzmechanismus gegen die Immunabwehr des Wirtes. Zudem wurde nachgewiesen, dass die Kapsel indirekt zu einer Inaktivierung des Komplementsystems führt und somit zu einer erhöhten Blutserumresistenz. Zudem spielt sie eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung von *H. influenzae* [182, 186]. Insgesamt sind die Interaktionen zwischen *Haemophilus* spp. und dem Komplement vielfältig [186]. Insbesondere kann *H. influenzae* sogenannte Komplementregulatoren wie z. B. Vitronectin und Plasminogen binden und damit die Komplementkaskade unterbinden [183, 186]. Zudem sind bekapselte *Haemophilus* Stämme in der Lage, IgA1-Proteasen zu bilden und so in Immunmechanismen auf Schleimhäuten einzugreifen [185].

In der Kultur können haemophile Bakterien in unterschiedlichen Kolonieformen wachsen. Man unterscheidet M-, S- oder R-Formen [91]. Kolonien der M-Form (mukoid) sind gross, trüb, konfluierend und schleimig. Ihre Oberfläche ist glänzend. Bakterien, die Kolonien der M-Form bilden, besitzen eine vollständige Kapsel. Bei der S-Form (smooth) sind die Kolonien klein, nicht konfluierend und fein. Bakterien der S1-Form besitzen z.T. noch eine Kapsel, daher werden S1-Formen (mit Kapsel) und S2-Formen (kapsellos) unterschieden. Die R-Form (rough) zeichnet sich durch grosse Kolonien mit teils gezackten Rändern aus. Eine Kapsel fehlt bei Bakterien, die R-Kolonieformen bilden, vollständig [91].

Ein weiteres Merkmal von Mitgliedern dieser Gattungen ist die Abhängigkeit von den Wachstumsfaktoren X und V. Mit der Ausnahme von *Histophilus somni* benötigen alle haemophilen Bakterien entweder den Einen oder Beide zum Wachstum (siehe Tabelle 2). Ursprünglich galt die Abhängigkeit von mindestens einem Wachstumsfaktor als Voraussetzung für die Zuordnung zur Gattung *Haemophilus* [157]. Diese Definition ist aber nicht eindeutig, da auch Vertreter anderer Genera eine V-Faktor-Abhängigkeit aufweisen können [158, 159]. Bei dem Faktor X handelt es sich um die prosthetische Gruppe Häm, die in Hämin oder dessen Vorläufern Protoporphyrinen vorkommt. Porphyrine sind prosthetische Gruppen der eisenhaltigen Cytochrome, Katalasen und Peroxidasen. Beim Faktor V handelt es sich um das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) bzw. Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADP). Die Faktoren sind Bestandteile des Blutes, sie werden aber erst nach dessen Erhitzung freigesetzt. Kochblut- oder Schokoladenagar beinhaltet demzufolge sowohl den X- als auch den V-Faktor. Es besteht auch die Möglichkeit dem Blutagar den V-Faktor durch das Auftragen eines V-Faktorsynthetisierenden Staphylokokken-Stammes zu supplementieren (Ammen- oder Satellitenphänomen). *Haemophilus*-Isolate, die vom V-Faktor abhängig sind, wachsen folglich auf Standard-Blutagar nur in unmittelbarer Umgebung der Amme (Abbildung 2) [2].



Abbildung 2: Ammen-Phänomen, [IVB Zürich]

Tabelle 2 zeigt eine Zusammenfassung der Abhängigkeit verschiedener *Haemophilus/Histophilus* Arten von X- und/oder V-Faktor.

Spezies	Wirt	V-Faktor- Abhängigkeit	X-Faktor- Abhängigkeit	Quelle
<i>H. parasuis</i>	Schwein	+	-	[20]
<i>H. paragallinarum</i>	Huhn	+/-	-	[149, 151]
<i>H. paracuniculus</i>	Kaninchen	+	-	[142]
<i>H. haemoglobinophilus</i>	Hund	-	+	[153]
<i>Histophilus somni</i> (<i>Histophilus ovis</i> / <i>H. agni</i>)	Schaf/Rind	-	-	[17, 150]
<i>H. influenzae</i>	Mensch	+	+	[154]

Tabelle 2: Faktorenabhängigkeit diverser *Haemophilus*-Stämme

2.4.1 *Histophilus somni*

Histophilus somni (*Haemophilus somnus*) wurde erstmals 1956 in Colorado, USA, als Verursacher einer infektiösen thromboembolischen Meningoencephalitis (ISTME/TEME) beim Rind identifiziert und beschrieben. Eine weitere Charakterisierung erfolgte 1960, als ein „*Haemophilus*-like organism“ verwendet wurde, um TEME in Kälbern experimentell zu induzieren [63].

Die taxonomische Stellung dieser Bakterienart war lange Zeit unklar. Die Tatsache, dass das Wachstum von *Histophilus somni* weder X- noch V-Faktor abhängig ist, lieferte eigentlich einen Widerspruch für die Einteilung in die Gattung *Haemophilus* [157]. Ausserdem konnte durch phylogenetische Analysen der 16S rRNA und RNA Polymerase B (*rpoB*-) Gensequenzen innerhalb der Familie der *Pasteurellaceae* gezeigt werden, dass sich *Histophilus somni* signifikant von *H. influenzae* (Typ-Spezies der Gattung *Haemophilus*) unterscheidet [9]. Inzwischen wird dieser Erreger innerhalb der Familie der *Pasteurellaceae* in die Gattung *Histophilus* eingeteilt. Ausserdem stellt die X- bzw. V-Faktorenabhängigkeit kein unbedingtes Kriterium für die Einklassifizierung in die Gattung *Haemophilus* mehr dar, da jetzt bekannt ist, dass diese auch bei anderen Vertretern der Familie auftreten kann und nicht auf die Gattung *Haemophilus* begrenzt ist [158, 159].

Die Spezies *Histophilus somni* umfasst inzwischen die früheren Spezies *Haemophilus somnus*, *Histophilus ovis* und *Haemophilus agni* [9]. *H. agni* wurde 1958 aus einem Schaf mit Septikämie isoliert [187]. Die biochemischen Eigenschaften von *H. agni* und *H. somnus* waren sehr ähnlich, ebenso zeigten beide eine sehr enge serologische Verwandtschaft. Danach wurde keine weitere Isolierung von *H. agni* beschrieben [168]. Jedoch wurde v.a. in Australien und Neuseeland *H. ovis* oft aus Schafen mit Septikämie, Synovitis und Epididymitis isoliert [144, 188]. DNA-DNA-Hybridisierungen zeigten, dass es sich bei diesen drei Bakterienarten um eine und dieselbe Spezies handelt. Die Hybridisierung stimmte in über 91% der Fälle überein [9], respektive in über 80% [31]. Trotz dieser Ergebnisse und obwohl bereits seit Pohl 1979 *Histophilus* als Genus innerhalb der Familie *Pasteurellaceae* gilt [166], wurden laut Kilian 2003 *H. somnus*, *H. agni* und *Histophilus ovis* in der 2. Ausgabe von *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* unter dem Genus *Haemophilus* als „other organisms“ aufgeführt [167]. Seit dem Jahr 2003 werden *H. ovis*, *H. somnus* und *H. agni* in einer Spezies mit dem Namen *Histophilus somni* gen. nov., sp. nov. zusammengefasst [9] und in der aktuellen Version der Taxonomie der *Pasteurellaceae* von 2009 ist *Histophilus somni* nun offiziell aufgeführt (Abb. 1).

2.4.1.1 Eigenschaften, Vorkommen, Verbreitung

Histophilus somni ist mit seinen Eigenschaften, i.e. gramnegativ, fakultativ anaerob, unbeweglich, nicht sporenbildend und pleomorph, z.T. kokkoid, ein charakteristischer Vertreter der Familie *Pasteurellaceae*. Das Bakterium besitzt keine Kapsel und stellt hohe Ansprüche an die Nährmedien [17]. Die Mikroaerophilie ist charakteristisch. 5-20% CO₂ sind für die Erstanzüchtung notwendig. Zur Anzüchtung geeignete Nährmedien sind Kochblutagar oder Nährböden, die 20% Schafblut enthalten. Die Kolonien von *H. somni* erscheinen auf Blutagar gelblich pigmentiert, manche Stämme bewirken sogar eine Hämolyse. Es werden weder Katalase noch Urease oder H₂S gebildet, die Oxidase- und Indolreaktion fällt jedoch positiv aus [2].

Das Wachstum von *Histophilus somni* ist weder von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD, V-Faktor) noch von Hämin (X-Faktor) abhängig. Blut oder Blutfaktoren sowie ein gewisser Anteil an Kohlendioxid in der Atmosphäre sind jedoch für sein Wachstum auf Agarplatten essentiell. Für die Vermehrung in flüssigen Anreicherungsmedien ist die mikroaerophile Umgebung für das Wachstum nicht erforderlich, jedoch sollte Thiamin-Monophosphat oder Thiamin-Pyrophosphat zugegeben werden [17]. Die Labordiagnose und die Spezies-Differenzierung von *Histophilus somni* im Labor ist aufgrund der starken Heterogenität in den biochemischen, morphologischen und antigenen Eigenschaften nicht immer eindeutig [168, 189, 190, 191]. Daher gibt es relativ wenig epidemiologische Daten zu *Histophilus somni*-Infektionen.

Die Tenazität von *Histophilus somni* ist stark temperaturabhängig. Im Blut und im Nasensekret überlebt *Histophilus somni* beispielsweise bei 23,5°C ca. 75 Tage, bei 3°C nur noch jeweils einen Tag. Ausserhalb des Körpers können die Bakterien allgemein nur kurze Zeit überleben. Im Vaginalsekret zum Beispiel gerade einmal fünf Tage und im Urin sogar weniger als eine Stunde bei den gleichen Umweltbedingungen [37]. Daraus kann man ableiten, dass die Tenazität von *Histophilus somni*-Isolaten im Allgemeinen eher gering ist, was mit ihren Wachstumsansprüchen und dem Fakt, dass sie keine Kapsel besitzt, in Zusammenhang gestellt werden kann.

Bakterien der Gattung *Histophilus* kommen als Bestandteil der residenten Mikroflora auf den Schleimhautoberflächen des Respirations- und Genitaltrakts von Rind und Schaf und anderen Wiederkäuern (wie z.B. Nordamerikanische Bisons) vor. Der Genitaltrakt wird als Reservoir angesehen. Bullen tragen dieses Bakterium auf ihrer Präputialschleimhaut. Es wird jedoch auch in der Blase und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gefunden [17, 57, 58, 66, 67, 226]. Erkrankungen können auftreten, wenn *Histophilus somni* als primäres Pathogen oder opportunistisches Pathogen allein oder in Vergesellschaftung mit anderen Bakterien oder Viren auftritt und möglicherweise weitere krankheitsfördernde Bedingungen

vorherrschen [35]. So kommt es vor allem bei intensiv gehaltenen Tieren oder beim Transport zum Ausbruch von *Histophilus somni*-assoziierten Krankheiten. *Histophilus somni* ist weltweit verbreitet; die meisten Fälle von Erkrankungen mit *Histophilus somni* treten aber in Kanada, den USA, in Teilen von Westeuropa und in Skandinavien auf [17]. *Histophilus somni*-Infektionen werden durch direkten Kontakt über Sekrete des Respirationstrakts von akut oder chronisch infizierten Trägertieren übertragen. Eine aerogene Übertragung wird diskutiert, ist aber bislang nicht eindeutig nachgewiesen [168]. Die Inkubationszeit variiert zwischen 2 und 21 Tagen in Abhängigkeit von anderen Faktoren, wie allgemeiner Gesundheitszustand der Tiere oder Stress [168].

2.4.1.2 Virulenzfaktoren

Histophilus somni ist wie die meisten Schleimhautparasiten opportunistisch pathogen. Das heisst, *Histophilus somni* besiedelt als nicht invasiver Kommensale die Schleimhaut des Respirations- und Reproduktionstraktes des Rindes. Treten Faktoren wie zum Beispiel Stress, Extremtemperaturen, Überbelegung etc. auf, kann das Immunsystem des Wirtes supprimiert und eine Krankheit begünstigt werden [217]. Insgesamt findet man auf dem Genom von *Histophilus somni* Gene, die für zwölf hochmolekulare Adhäsine kodieren. Bei diesen Adhäsinen handelt es sich offensichtlich um Autotransporter, die das Sec-Sekretionssystem für ihren Transfer durch die innere Membran nutzen [228].

Zudem sind virulente Stämme von *Histophilus somni* in der Lage, Immunglobuline an ihre Fc-Rezeptoren zu binden. Auf diese Weise ist es ihnen möglich, dem Komplementsystem des Wirtes zu entkommen [212, 213, 214, 215, 216]. Als weiterer Virulenzfaktor kann die Zytotoxizität von *Histophilus somni* genannt werden, welche es ihm ermöglicht der Phagozytose durch Wirtszellen zu entkommen [217]. Studien zeigten, dass die Funktion von bovinen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen durch *Histophilus somni* negativ beeinflusst werden kann und sogar die Replikation von phagozytierten Bakterien dadurch gefördert wird. Solange die Bakterien intrazellulär verbleiben, ist es *Histophilus somni* ebenfalls möglich der humoralen Immunantwort des Wirtes zu entkommen [218, 219, 220]. Ein wichtiges Oberflächen-Protein von *Histophilus somni* stellt das LOS dar. Es dient als Schlüsselfaktor in der gesamten humoralen Immunantwort. Gewinnt oder verliert das LOS von *Histophilus somni* an Epitopen wird von Phasenvariation des LOS gesprochen. Dieser Vorgang findet sowohl *in vivo* als auch *in vitro* statt [217, 221]. Neben der Phasenvariation des LOS wird bei *Histophilus somni* zudem molekulares Mimikry beobachtet, das eine Immunevasion zur Folge haben kann, da dadurch bestimmte Antigene des Erregers durch das Immunsystem des Wirts nicht erkannt werden können [222, 223, 224]. Als weitere Virulenzfaktoren von *Histophilus somni* sind die Sekretion von Exopolysacchariden und die Biofilmbildung zu nennen. Es ist noch nicht bekannt ob die Sekretion von

Exopolysacchariden mit der Biofilmbildung im Zusammenhang steht oder ob sie alleine zur Virulenz des Erregers beiträgt. Sicher ist jedoch, dass virulente Isolate *in vitro* signifikant mehr Biofilm produzieren als kommensale Isolate [17]. Die Zytotoxizität in bovinen Endothelzellen gilt als weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *Histophilus somni*, welcher das Kardinalsymptom der Krankheit, die Vaskulitis, verursacht. Thompson und Little konnten dieses Phänomen 1981 *in vitro* belegen [225].

2.4.1.3 Verursachte Krankheiten

Histophilus somni kann sowohl beim Rind als auch beim Schaf zu Erkrankungen führen [38]. Krankheits-Ausbrüche treten oft im Zusammenhang mit Stress und bei Massentierhaltung auf [17]. Asymptomatische Träger sind häufig [41].

Da *Histophilus somni* zu verschiedenen Krankheiten führen kann, werden diese als *Histophilus*-Krankheits-Komplex oder Haemophilose zusammengefasst [26]:

1. Infektiöse, septikämisch-thrombosierende Meningoencephalitis (ISTME) und thromboembolische Meningoencephalitis (TEME)
2. Septikämien mit Fieber, Allgemeinstörungen, pneumonischen und zentralnervösen Symptomen
3. Arthritiden (Folge der Septikämie)
4. Endometritiden, Aborte, Geburt lebensschwacher Kälber
5. Mastitiden

1. ISTME/TEME

Hierbei handelt es sich um die nervöse Form der Erkrankung. Nach einer Infektion über den Respirationstrakt kommt es im Anschluss an eine septikämische Streuung zur Ausbildung von Vaskulitis, Thrombosen und hämorrhagischen Infarkten im Gehirn. Betroffen sind vor allem Kälber im Alter von sechs bis zehn Monaten. Im Anfangsstadium zeigen die Tiere hohes Fieber von über 40°C und hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden mit Anorexie und Apathie. Eine Untersuchung der Augen zeigt Retinablutungen ohne klar sichtbare Grenzen. Weitere klinische Symptome, die auftreten können sind Lahmheiten der Hinterextremitäten, Husten, Inkoordination, Steifheit und geschwollene Gelenke. Betroffene Tiere können kurze Zeit nach dem Auftreten der klinischen Symptome festliegen und kurz darauf sterben. Zum Teil sterben die Tiere auch plötzlich, ohne zuvor klinische Symptome zu zeigen [61, 62].

2. Septikämien mit Fieber, Allgemeinstörungen, pneumonischen und zentralnervösen Symptomen:

Histophilus somni kann ins Blut gelangen und somit in verschiedene Organe des Körpers verteilt werden. Beschriebene Organe, in welche sich dieses Bakterium ausbreitet, sind Gehirn, Herz, Skelettmuskeln, Gelenke, Leber, Larynx und Niere [61, 62, 63, 64]. Die Klinik ist vom betroffenen Organsystem und der Resistenzlage des betroffenen Tieres abhängig [26].

Die Myokarditis ist eine Manifestation der Septikämie, die genauer untersucht ist. In der Pathologie werden typischerweise endokardiale Hämorrhagien und Perikarditiden gefunden [38, 63, 64]. Bei den betroffenen Tieren handelt es sich vor allem um Jährlinge und Kälber, die gerade abgesetzt wurden. Der Tod tritt meistens plötzlich ein. Als Ursache wird akutes Herzversagen genannt. Einige verstorbene Tiere erscheinen zuvor noch völlig gesund, andere leiden vorgängig an einer chronischen Krankheit. Die meist grossen Läsionen, die in Form von Abszessen vorliegen, sind normalerweise in der Wand des linken Ventrikels zu finden. Als Folge der Linksherzinsuffizienz können ein Lungenödem und Lungenkongestionen angetroffen werden [65]. Die genannten Lungenveränderungen können fälschlicherweise leicht mit einer interstitiellen Pneumonie verwechselt werden, wobei die korrekte Diagnose anschliessend nicht gestellt wird. Die genaue Untersuchung des Herzens ist essentiell um schlussendlich zur richtigen Diagnose zu gelangen [26].

Die respiratorische Form der *Histophilus somni* Infektion erlangt immer mehr an Aufsehen. Zu einer Septikämie soll es angeblich kommen, wenn der Erreger über den Respirationstrakt aufgenommen wird. *Histophilus somni* kann sowohl im oberen als auch im unteren Respirationstrakt Erkrankungen auslösen. Beschriebene Krankheiten, die den oberen Respirationstrakt betreffen, sind Laryngitis und Tracheitis [39], wobei *Histophilus somni* oft als einziger Keim aus den Läsionen isoliert werden kann. Zum Teil handelt es sich um Mischinfektionen mit anderen Bakterien wie *Pasteurella*, *Actinomyces*, *Fusobacterium* und Clostridien [39, 40]. Erkrankungen, die den unteren Respirationstrakt betreffen, treten oft im Zusammenhang mit der transmissiblen Meningoencephalitis auf, die in Punkt eins beschrieben wurde [39, 61, 62]. Eine retrospektive Studie mit 297 Rindern hat diesen Zusammenhang belegt. Bei 244 (82%) von diesen 297 Rindern wurde eine Meningoencephalitis diagnostiziert, 190 (64%) davon litten an respiratorischen Symptomen. Von diesen 190 Rindern mit Symptomen der unteren Atemwege, wiesen 142 (75%) auch Veränderungen des Gehirnes auf [25].

Ein Begriff der hier noch erwähnt werden soll ist das sogenannte Shipping Fever, bei dem *Histophilus somni* ebenfalls zusammen mit *Mannheimia haemolytica* und *Pasteurella multocida* zur Pneumonie führen kann [17].

3. Arthritiden (Folge der Septikämie):

Als Folge einer Septikämie mit *Histophilus somni* kann eine Arthritis auftreten. Betroffene Tiere zeigen Lahmheit, geschwollene Gelenke, Steifheit und Stolpern. Meist sind mehrere Gelenke gleichzeitig betroffen. In solchen Fällen wird folglich von einer Polyarthrititis gesprochen. Die in der Pathologie gefundenen Läsionen in den Gelenken weisen auf eine chronische Arthritis hin. Es werden charakteristische Veränderungen wie vermehrte Gelenksflüssigkeit und Fibrinkoagulate gesehen. Weiter können Ödeme, Kongestionen und petechiale Blutungen auf der Synovialmembran beobachtet werden [61].

4. Endometritiden, Aborte, Geburt lebensschwacher Kälber:

Der Reproduktionstrakt bietet für *Histophilus somni* eine ideale Nische. Vor allem die Präputialschleimhaut des Bullen wird als Reservoir angesehen [2], wobei dieser Keim auch aus der Blase und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen isoliert werden kann [57, 66, 67]. *Histophilus somni* kann bei der Kuh zu Vaginitis, Cervicitis und Endometritis führen, wird aber auch auf der Vaginalschleimhaut gesunder Kühe gefunden. Ob er auch als Ursache für eine Infertilität in Frage kommt, ist noch nicht eindeutig beschrieben, da er sowohl den Genitaltrakt von fertilen als auch infertilen Rindern besiedelt [41]. Experimentell konnten Aborte durch eine *Histophilus somni*-Infektion in allen Stadien der Trächtigkeit ausgelöst werden. 11 trächtigen Kühen wurden dafür Isolate aus Aborten intravenös in die Jugularvene injiziert. Fünf von ihnen abortierten. Weiteren acht trächtigen Kühen wurden Isolate intrabronchial verabreicht, wobei eine Kuh ihren Fötus resorbierte [42]. Kühe, die nicht abortieren oder resorbieren, obschon sie mit *Histophilus somni* infiziert sind, bringen Kümmerer zur Welt, die schon kurz nach der Geburt sterben können [68, 69].

5. Mastitiden:

Da bekannt war, dass *Histophilus ovis* eine Mastitis beim Schaf verursacht, wurde angenommen, dass für *Histophilus somni*, der sich anhand der DNA-Sequenz kaum von *Histophilus ovis* unterscheiden lässt [9], dasselbe gilt [46]. Experimentell konnten chronische und gangränöse Mastitiden bei Milchkühen erzeugt werden [44]. In Nordamerika und Europa traten in der Folge auch spontane klinische Mastitiden auf [43, 45]. Bakterienkulturen beschränkten sich in der Regel auf ein Euterviertel. Die Milchproduktion blieb nahezu aus und das Sekret variierte in der

Zusammensetzung. Zum Teil war es blutig bis wässrig mit kleinen Fibrin-Klumpen [45], dann wiederum weiss, homogen mit der Konsistenz wie Joghurt, ohne Hinweise auf Blut oder Fibrin-Klumpen [43].

Beim Schaf, bei dem die Präputialschleimhaut ebenfalls ein wichtiger Kolonisationsort für haemophile Bakterien ist, wird *Histophilus somni* mit Septikämien, Mastitiden und Nebenhodenentzündungen in Zusammenhang gebracht [47]. Asymptomatische Trägartiere, die den Erreger auf Präputial- oder Vaginalschleimhaut tragen, sind auch beim Schaf weit verbreitet. Experimentell konnten Meningitiden beim Lamm nach intracisternaler Inokulation oviner *Histophilus somni*-Stämme erzeugt werden [34].

Im Unterschied zum Rind ist beim Schaf kein Zusammenhang zwischen einer *Haemophilus*-Infektion und anschliessendem Abort ersichtlich. Jedoch ist eine deutliche prozentuale Assoziation zwischen *Haemophilus*-Status und verlammen zu sehen. In der Studie von Rosendal [36], 1990, konnte gezeigt werden, dass es in infizierten Herden zu 12% Aborten kam, im Gegensatz zu nicht Infizierten mit 6% Aborten. Daraus kann geschlossen werden, dass eine Infektion mit *Histophilus somni* bereits vor der Trächtigkeit eine grössere Rolle spielt als eine während der Trächtigkeit [36].

Das Halten von Rindern und Schafen auf demselben Hof stellt einen Risikofaktor dar, bei dem möglicherweise Übertragungen zwischen den Spezies eine Rolle spielen können. Weitere Studien sind aber nötig, um diese Annahme zu beweisen [36].

2.4.1.4 Diagnose

Die Diagnose des "*Histophilus somni* disease complex" kann sich, abhängig vom betroffenen Organsystem, einfach, schwierig oder sogar unmöglich gestalten. Führt beispielsweise eine Encephalitis, welche durch *Histophilus somni* verursacht wurde, bei einem Kalb zum Tode, können sekundär Anzeichen einer Magendrehung beobachtet werden. In einem solchen Fall wird die Diagnose Hämophilose auch von einem routinierten Praktiker oder Pathologen verpasst, wenn er nicht Hirn, Herz und Lunge histologisch und mikrobiologisch untersucht [26].

Es kann auf verschiedene Arten versucht werden eine Diagnose zu stellen:

1. Klinisch:

Meist liefert die Klinik eine Verdachtsdiagnose, wobei auch an die verschiedenen Differenzialdiagnosen wie virusbedingte Atemwegsserkrankungen, infektiöse Aborte anderer Genese, Tollwut, Listeriose, Clostridiose und Zerebrokortikalnekrose gedacht werden muss [2]. Bei Fällen mit Polyarthrititis muss man als Differenzialdiagnose *Mycoplasma bovis* in Betracht ziehen [51].

2. Pathologisch-anatomisch:

Bei dieser Untersuchung sind im Falle einer thrombosierenden Meningoencephalitis kleine hämorrhagische und nekrotische Stellen im Hirn auffindbar [38].

3. Bakteriologisch:

Die Isolierung des Bakteriums in Reinkultur aus Gelenken, Herz, Lunge und anderen betroffenen Lokalisationen ist beweisend für eine Infektion mit *Histophilus somni*. Bei Verdacht auf transmissible Meningoencephalitis bei einem Kalb mit Fieber kann eine Blutkultur manchmal nützlich sein, um eine durch *Histophilus somni* verursachte Septikämie zu entdecken. Wichtig für eine brauchbare, aussagekräftige Blutkultur ist, dass das Kalb nicht mit Antibiotika behandelt wurde [48]. Da die Tenazität von hämophilen Bakterien ausserhalb des Körpers gering ist [37] und sie in Transportmedien nicht lange überleben ist es sehr wichtig, dass die entsprechenden Proben gekühlt oder bei Raumtemperatur so schnell wie möglich ins Labor gebracht werden [49].

4. Serologie:

Serologische Tests sind ebenfalls verfügbar, erbringen aber nicht alle Informationen, die zur Diagnose benötigt werden. Viele Tiere sind inapparente Träger oder durchlaufen eine subklinische Infektion, sodass sie auch serokonvertieren. Der serologische Titer darf aber nicht mit einer klinischen Erkrankung gleichgesetzt werden [52-56]. Steigt der Titer jedoch bei kranken Tieren signifikant an, sichert dies die Verdachtsdiagnose ab [58]. Zurzeit finden zwei Tests Anwendung: Ein Mikroagglutinationstest und ein ELISA-Test [53, 57]. Die serologischen Tests werden laufend verbessert und werden vor allem in Zukunft an Bedeutung gewinnen [26].

5. Biochemische Verfahren:

Als weitere diagnostische Merkmale können die Oxidasereaktion, die im Falle von *Histophilus somni* positiv ausfallen sollte oder die Katalase-, Urease- und H₂S-Reaktionen angewendet werden, welche ein negatives Resultat liefern sollten [157].

Ein Spezialfall im Bezug auf die Diagnose ist die durch *Histophilus somni* verursachte Pneumonie. Ihre Diagnose erfordert gleichzeitig eine pathologische und bakteriologische Untersuchung. Die sichere Diagnose kann nur gestellt werden, wenn beide Untersuchungen positiv ausfallen. Die Probe für die bakteriologische Untersuchung sollte hierfür an der Grenze zwischen gesundem und erkranktem Gewebe genommen werden,

da die Bakterien dort am ehesten gefunden werden [50]. Gewebe derselben Region sollte immer gekühlt, nicht aber gefroren, ans Labor mitgeliefert werden, um davon ebenfalls eine bakterielle Kultur anzusetzen. Obwohl es meist unmöglich ist, ist es auch hier wieder von grosser Wichtigkeit, die Proben von Tieren zu nehmen, die nicht mit Antibiotika behandelt wurden, da diese die Bakterien zerstören und eine bakterielle Kultur verunmöglichen [48].

2.4.1.5 Therapie und Prophylaxe

Histophilus somni ist für die meisten Antibiotika empfindlich [26]. Erythromycin, Penicillin, Sulfonamide und Oxytetracycline zeigen eine gute Wirkung gegen *Histophilus somni* Infektionen, wobei Oxytetracycline am häufigsten eingesetzt werden [160, 161, 162]. In Dänemark wurde eine Untersuchung mit 80 *Histophilus somni*-Stämmen aus dem dänischen Veterinär-Institut durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass fast alle in der Studie verwendeten Stämme gegen Antibiotika, die derzeit für die Therapie eingesetzt werden, empfindlich sind. Nur zwei der 80 Stämme zeigten Resistenzen, die gegen die Kombination Trimethoprim und Sulfonamid gerichtet waren [16]. In einer Studie aus den USA waren ebenfalls die meisten untersuchten Stämme empfindlich für Ampicillin (89%), Ceftifur (100%), Erythromycin (89%), Spectinomycin (87%), Tetracyclin (93%) und Tilmicosin (80%). Nur wenige waren für Sulfamethazin (36%) empfindlich [59]. In einer weiteren Studie von Vogel et al. [60] waren alle Isolate empfindlich für Penicillin, Erythromycin, Enrofloxacin und Gentamicin. Resistenzen wurden bei 50% der Stämme gegen Streptomycin, bei 69% gegen Neomycin, bei 25% gegen Tetracyclin, bei 94% gegen Sulfonamide und bei 6% gegen die Kombination von Trimethoprim und Sulfonamid beobachtet [60].

Befriedigende Präventions- und Kontrollmassnahmen sind noch nicht verfügbar. Jedoch ist bekannt, dass bei einem Ausbruch der Erkrankung (Meningoencephalitis, Pneumonie) eine alleinige Antibiotikatherapie erkrankter Tiere selten zum Erfolg führt, die Krankheit schnell fortschreitet und Trägartiere weiter existieren [26, 92]. Die einzige Möglichkeit ist, die Tiere durch eine Immunisierung vor einer Infektion zu schützen. Forschungen zeigten, dass humorale Antikörper gegen *Histophilus somni* wirksam sind und eine Immunisierung mit einem inaktivierten Impfstoff zu hohen spezifischen Antikörperkonzentrationen mit bakterizider Wirkung im Blut führt [93]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine Revakzination nötig ist, um die Immunantwort zu verbessern und so die meisten Tiere schützen zu können [94, 95]. Zahlreiche Totimpfstoffe stehen zur Verfügung, aber nur einer wurde ausreichend untersucht (Somnugen-Boehringer Ingelheim, Burlington, Ontario) [94-99]. Kontrollierte Studien zeigten, dass eine zweimalige Impfung ausreicht,

um die Morbidität und Mortalität nach einer intravenösen, intracisternalen oder aerogenen *Histophilus somni*-Infektion signifikant zu senken, [94, 95, 100].

2.4.2 *Haemophilus parasuis*

Haemophilus parasuis ist der Erreger der Glässer'schen Krankheit (auch bekannt als Transportkrankheit, Glässer-Syndrom, porcine Polyserositis und Polyarthritits). Diese Krankheit wurde erstmals 1910 durch Glässer als fibrinöse Pleuro-Perikarditis und Peritonitis beschrieben [20, 192].

Der Erreger selbst wurde erstmals durch Schermer und Ehrlich 1922 [21,164] isoliert und durch Hjërre und Wramby (1943) [237] als *H. suis* beschrieben. In späteren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass der Erreger der Glässer'schen Krankheit im Gegensatz zu der Erstbeschreibung von *H. suis* in seinem Wachstum nicht X-Faktor abhängig ist, sondern nur V-Faktor-abhängig [70]. Viele der zuerst als *H. suis* beschriebenen Isolate wurden deshalb und aufgrund verbesserter Methoden als *H. parasuis*-Stämme eingruppiert.

Zur innerartlichen Differenzierung von *H. parasuis* werden beispielsweise die Proteinmuster und die serologische oder die genomische Typisierung angewendet [21]. Auf diese Weise werden derzeit mindestens 15 Serovare unterschieden. Es muss jedoch erwähnt werden, dass eine grosse Anzahl untypisierbarer *Haemophilus parasuis*-Isolate existieren [74].

2.4.2.1 Identifizierung, Vorkommen, Verbreitung

Bei *H. parasuis* handelt es sich, entsprechend den Merkmalen der Gattung *Haemophilus*, um gramnegative, unbewegliche, kleine, kokkoide und pleomorphe Stäbchen, die gelegentlich Fäden bilden können. [70].

Insbesondere sind unbekapselte Stämme ausgeprägt pleomorph und man findet verschiedene Strukturen von Stäbchen über Fadenformen [20]. Bekapselte *H. parasuis* Stämme sind vermehrt kokkoid, können aber in embryonierten Hühnerei-Kulturen auf Chorion-Allantois-Membranen Filamente und Fimbrien-ähnliche Strukturen bilden [71].

H. parasuis ist, wie alle Vertreter der Gattung *Haemophilus*, hinsichtlich seiner Wachstumsbedingungen sehr anspruchsvoll. Da aber *H. parasuis* in der Lage ist Porphyrin aus δ -Aminolävulinsäure zu bilden, ist *H. parasuis* von der exogenen Häminzuführung (X-Faktor) unabhängig [70]. Dagegen ist das Wachstum von *H. parasuis* abhängig vom V-Faktor (NAD), d. h. für Oxidoreduktionsprozesse während der Vermehrung ist *H. parasuis* auf exogen zugeführtes NAD angewiesen. NAD wird z.B. durch Hitzebehandlung aus den Blutzellen freigesetzt. Dieses Phänomen wird in der Routinediagnostik bei der Herstellung des sog. Kochblutagars (i.e. Schokoladenagars) verwendet [91]. Ausserdem wird in der

Routinediagnostik häufig das sogenannte Ammenphänomen angewendet, bei dem man die NAD-Überproduktion einiger Bakterienarten ausnützt. So werden z.B. Staphylokokken-Isolate häufig als Ammen verwendet [33]. Auf Blutagar wächst *H. parasuis* daher in der Zone um die gleichzeitig ausgestrichene Staphylokokken-Ammen. Der Erreger verursacht keine Hämolyse, ist Urease- und Oxidase-negativ und Katalase-positiv. *H. parasuis* produziert kein Indol, reduziert Nitrat und fermentiert Glukose, Galaktose, Mannose, Fructose, Saccharose und Maltose [22]. Einzelne Isolate können eine Kapsel bilden, die z.B. durch Kapselfärbungen sichtbar gemacht werden kann. Durch die Kapselbildung kommt es zur Ausbildung von verschiedenen Kolonieformen [91]. Man unterscheidet (1) die M-Kolonieform (mukoid) mit grossen, schleimigen, konfluierenden Kolonien. Bakterien in der M-Form besitzen eine Kapsel. (2) Die S-Kolonieform („smooth“) mit kleinen, nicht-konfluierenden Kolonien. Bakterien der S-Form besitzen nur noch teilweise eine Kapsel. (3) Die R-Kolonieform („rough“) mit grossen, z.T. gezackten Kolonien, welche keine Kapsel besitzen.

Bei *H. parasuis* werden verschiedene Serovare unterschieden. Erstmals wurden 1952 mit Hilfe eines Langsamagglutinationstests die vier Serovare A, B, C und D beschrieben [72]. Später wurden drei weitere Serovare ergänzt, so dass sieben Serovare (1-7) beschrieben wurden (1986) [73]. Ein paar Jahre später (1991) kamen noch sechs (Jena6 - Jena12) dazu [75] gefolgt von weiteren fünf im Jahre 1992 (ND1-ND5) [74]. Da innerhalb der Serovare Jena und ND einige identisch waren, wurden sie später als Serovare 8-15 beschrieben. Zusammengefasst sind heute folglich 15 Serovare von *H. parasuis* bekannt [74]. Das von Kielstein-Rapp-Gabrielson [74] etablierte und meistens verwendete Serotypisierungssystem beruht auf hitzestabilen Antigenen (Polysacchariden), die mittels Serovar-spezifischen Antiseren im Agargelpräzipitationstest bestimmt werden [74]. Dieses System ist das international anerkannte System zur Serotypisierung von *H. parasuis*. Die Prävalenz der einzelnen Serovare wurde in mehreren Ländern weltweit untersucht. In Japan [101], Deutschland [74], USA [103], Spanien [107], Canada [104] und China [23] wurde das Serovar 4 am häufigsten isoliert gefolgt von Serovar 5. In Australien [105, 102] und Dänemark [106] dominierten die Serovare 5 und 13. Zudem wurde in allen Studien ein sehr hoher Anteil nicht typisierbarer Serotypen festgestellt. Dieser Anteil lag in z.B. Deutschland bei 26% [74], in Nordamerika bei 15 % [103] und in Australien bei 41 % [102]. Daher ist davon auszugehen, dass es mehr als 15 Serotypen gibt [74; 102]. Eine Korrelation zwischen Serovar und Virulenz konnte bislang für die 15 beschriebenen Serovare nicht nachgewiesen werden, vielmehr herrscht eine grosse Heterogenität in der Virulenz zwischen einzelnen Isolaten desselben Serovars vor.

Aufgrund des Auftretens von kommensalen *H. parasuis* im Respirationstrakt und pathogenen *H. parasuis* ist die Differenzierung von Isolaten und Stämmen von besonderer

Bedeutung. Um die Möglichkeiten der Epidemiologie bzw. molekularen Epidemiologie hinsichtlich der Beurteilung von Ausbrüchen signifikant zu verbessern, wurden verschiedene Genotypisierungsmethoden mit grossem diskriminatorischen Potential entwickelt. Beschrieben wurden u.a. Methoden wie ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR; [227] AFLP (amplified fragment length polymorphism) [193], PFGE (pulse field gel electrophoresis) [193] and MLST (multilocus sequence typing) [194].

Bei *H. parasuis* handelt es sich ebenfalls um einen Schleimhautbewohner. Er besiedelt als Kommensale den oberen Respirationstrakt von Schweinen. Unter bestimmten Umständen kann der Erreger jedoch zu diversen Krankheiten führen [21]. Als Reservoir für den Erreger in infizierten Herden werden Muttersauen angesehen. Diese übertragen ihn auf die Ferkel. Bei den Ferkeln wird zwischen einer Infektion mit einem virulenten und einer Infektion mit einem avirulenten Stamm unterschieden. Der Verlauf der Infektion ist unterschiedlich. Ferkel, die mit pathogenen Stämmen infiziert werden entwickeln sich zu subklinischen Trägartieren, die epidemiologisch von grosser Bedeutung sind. *Haemophilus parasuis* konnte auch bei Wildschweinen nachgewiesen werden. Weitere Studien sind jedoch noch nötig, um zu eruieren, ob Wildschweine eine mögliche Infektionsquelle für Hausschweine darstellen [30].

2.4.2.2 Verursachte Krankheiten

Infektionen mit *Haemophilus parasuis* haben weltweit an Bedeutung zugenommen [20]. Für diese deutliche Zunahme der Glässer'schen Krankheit werden intensive Haltungsbedingungen, ein frühes Absetzen der Ferkel und virale Co-Infektionen mit dem porcinen Circovirus Typ 2 (PCV-2) oder dem Virus des porcinen respiratorischen und reproduktiven Syndroms (PRRSV) verantwortlich gemacht [21, 195].

Als prädisponierende Faktoren sind schlechte Hygiene, inadäquate Fütterung und schlechtes Herdenmanagement zu nennen. Werden Tiere unterschiedlichen Alters zusammen gehalten, treten Krankheitsausbrüche gehäuft auf [87]. Die Folgen dieser Erkrankung sind wirtschaftliche Verluste und teure Antibiotikabehandlungen. Heute ist das Ziel, spezifische pathogen-freie Herden und solche mit einem guten Gesundheitszustand zu bilden [20]. Findet die Infektion mit einem apathogenen Stamm statt, sind die Ferkel durch kolostrale Antikörper geschützt. Das Problem ist, dass der Anteil an kolostralen Antikörpern im Alter von fünf bis sechs Wochen zum Zeitpunkt des Absetzens abnimmt. In diesem Zeitraum erkranken deshalb die meisten Tiere, da der Schutz durch die kolostralen Antikörper fehlt und das eigene Immunsystem die Ferkel noch nicht ausreichend schützen kann. Ein weiterer Aspekt, der den Ausbruch der Krankheit begünstigt, ist der Stress, dem die Ferkel beim Absetzen ausgesetzt sind [80, 81].

Haemophilus parasuis kann beim Schwein folgende Krankheiten verursachen [33]:

1. Glässer'sche Krankheit
2. Respiratorisches Syndrom
3. Pneumonie

1. Glässer'sche Krankheit:

Charakterisiert wird diese Erkrankung durch das Auftreten von fibrinöser Polyserositis, Meningitis und Arthritis [21, 30]. Der Erreger wird durch direkten Kontakt mit infizierten Schweinen übertragen. Eine indirekte Übertragung ist nur hypothetisch denkbar. Der Erreger wird meist durch Zukauf infizierter Schweine in eine Herde eingeschleppt [81]. Zur Manifestation der Krankheit kommt es vor allem nach belastenden Situationen wie Transport, schlechtes Stallklima, Futtermängel, Umstellungen, Kälte oder Hitze [87, 24]. Die meisten Erkrankungen treten bei Mastferkeln zwei bis acht Tage nach Einstellung in den Mastbetrieb auf [24]. Grundsätzlich sind aber alle Alterskategorien empfänglich und können erkranken [81]. Das klinische Bild ist geprägt von Lahmheiten bis hin zum Festliegen der Tiere, Fieber und hochgradiger Bewegungsunlust. Weitere oft beobachtete klinische Symptome sind Husten, Atemnot (Pleuritis, Pneumonie) und ein steifer Gang (Meningitis, Polyarthritis). Oft ist eine Entzündung der Bindehaut (gerötete Augen) und Schwellungen am Kopf, ähnlich wie bei PRRS, zu sehen. Bei schwer betroffenen Schweinen kann Zyanose an Ohren, Rüsselscheibe und Gliedmassen beobachtet werden. Bei Zuchttieren kann eine Infektion mit *H. parasuis* zu Aborten führen. Todesfälle können auftreten. In der Regel sind die Organe unterschiedlich stark betroffen. Nach einer durchgemachten Infektion kann davon ausgegangen werden, dass der Erreger fortan die oberen Atemwege der Schweine besiedelt. Ebenfalls hat sich in der Regel eine wirkungsvolle Bestandesimmunität aufgebaut. Diese Situation wird in den meisten Beständen der Schweiz und der EU vorgefunden [24].

Als Differentialdiagnosen können Infektionen mit Mykoplasmen, Chlamydien, Staphylokokken, Streptokokken, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* und *Pasteurella multocida* in Frage kommen [2].

2. Respiratorisches Syndrom:

Akute Erkrankungen treten nur gelegentlich auf. Klinisch erkranken vor allem Jungtiere, die vermehrt Stress ausgesetzt sind [20].

3. Pneumonie:

Sekundär zu einer viralen Infektion kann *Haemophilus parasuis* eine Pneumonie ohne Polyserositis auslösen. Andere Bakterien wie *Pasteurella* oder Mykoplasmen können ebenfalls am Verursachen einer Pneumonie beteiligt sein [1, 164].

Hoefling (1994) beschreibt neben den drei genannten Krankheitsverläufen noch die akute Myositis des Masseter-Muskels, als weitere mögliche Verlaufsform einer Infektion mit *Haemophilus parasuis* [22].

2.4.2.3 Virulenzfaktoren

Über die Virulenzfaktoren bzw. über die innerhalb der Spezies *H. parasuis* auftretenden grossen Unterschiede hinsichtlich der Virulenz ist wenig bekannt. Die Serovare 1, 5, 10, 12, 13 und 14 werden als hochvirulent beschrieben. Werden Schweine mit diesen Serovaren intraperitoneal infiziert, führen sie innerhalb von vier Tagen zu einer hohen Morbidität und Mortalität unter den Schweinen [74, 76, 103]. Die Serovare 2, 4 und 15 gelten als moderat virulent. Diese drei Serovare verursachen eine Polyserositis, führen aber nicht zum Tod der Schweine. Die restlichen Serovare (3, 6, 7, 8, 9 und 11) führen zu keinen klinischen Symptomen und werden als avirulent bezeichnet [74, 76, 103]. Die Serovare 4 und 5 sind weitgehend mit Epidemien assoziiert [21, 23].

Als mögliche Virulenzfaktoren wurden bei *H. parasuis* eine Neuraminidase-Aktivität [196], Transferrin-bindende Proteine (TbpB und TbpA) [197] und Fimbrien [71] beschrieben. Ausserdem weiss man, dass einige *H. parasuis*-Isolate Polysaccharid-haltige Kapseln bilden [91, 198]. Untersuchungen zeigten, dass die meisten *H. parasuis*-Isolate aus dem Respirationstrakt gesunder Schweine eine Kapsel besitzen, dagegen waren die Isolate aus Schweinen mit Glässer'scher Krankheit signifikant seltener bekapselt [73, 199]. Somit wird davon ausgegangen, dass eine fehlende Kapselbildung mit der Virulenz assoziiert ist. Über die Sekretion von Toxinen durch *H. parasuis* ist bislang nichts bekannt.

Ein möglicher weiterer Virulenzfaktor ist das LPS bzw. LOS (Lipopolysaccharid/ Lipooligosaccharid), das als Bestandteil der äusseren Membran hinsichtlich Virulenz v.a. die Phagozytose durch Abwehrzellen des Wirts erschwert. Eine Studie zeigte jedoch, dass es keine signifikanten Unterschiede bei der LOS-Produktion von virulenten und avirulenten *H. parasuis*-Isolaten gab [78]. Eine weitere Studie zeigte, dass Tiere, welche mit einem Impfstoff, der sowohl LOS-Antigene als auch Antigene von anderen Membranproteinen enthielt, immunisiert wurden, keine Antikörper gegen das LOS bildeten. Es wurden nur Antikörper gegen andere Membranproteine gebildet [79]. Diese Fakten sprechen dafür, dass LOS kein wichtiger Virulenzfaktor von *H. parasuis* ist [20].

Über spezifische Invasionsmechanismen von *H. parasuis* weiss man bislang relativ wenig [11, 13, 28, 32]. Eine Studie zeigte, dass *Bordetella bronchiseptica* als prädisponierender Faktor für die *H. parasuis*-Besiedlung des oberen Respirationstraktes wirkt, vergleichbar zu Infektionen mit *Pasteurella multocida* bei der Rhinitis atrophicans des Schweines [35].

2.4.2.4 Diagnose

Klinische Symptome lassen meist nicht eindeutig auf eine *H. parasuis*-Infektion schliessen. Daher sind für die Diagnosestellung sowohl die Anamnese als auch die klinischen und pathologisch-anatomischen Veränderungen heranzuziehen [20]. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen sind gekennzeichnet durch serofibrinöse oder fibrinopurulente Exsudate und Entzündungen der serösen Häute. Man findet u.a. Polyarthritis, Pleuritis, katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonien, Perikarditis und Meningoencephalitis. In den Läsionen werden histopathologisch Neutrophileninfiltrate und Makrophagen gefunden. In schwerwiegenderen Fällen können Meningitis oder thrombolische Meningoencephalitis von vermehrter Produktion an Cerebrospinalflüssigkeit oder Arthritis begleitet sein. Veränderungen der Lunge werden selten gesehen. Petechien und Ekchymosen werden nach einer Septikämie in der Leber, den Nieren und im Gehirn gefunden. Akute Veränderungen infolge einer Septikämie, wie Zyanose oder subkutane und pulmonäre Ödeme werden nur selten beobachtet. Als Differentialdiagnosen zu diesen pathologischen Veränderungen kommen *Streptococcus suis* und *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Frage [76, 82].

Der Nachweis von *H. parasuis* bei klinischen Verdachtsfällen erfolgt durch Isolierung im mikrobiologischen Labor. Als Untersuchungsmaterial eignen sich Tupfer von fibrinösen Veränderungen, Exsudate oder Synovia. Da *H. parasuis* sehr anspruchsvoll und langsam-wachsend ist, lässt er sich nicht immer nachweisen [87]. Ausserdem ist der Nachweis bei antibiotisch vorbehandelten Tieren meist nicht möglich [81]. Für die Isolierung wird meist Blutagar mit einer *Staphylococcus aureus*-Amme verwendet. Die Amme dient als NAD-Quelle (V-Faktor). Die *H. parasuis*-Kolonien sind direkt in Ammen-Nähe sichtbar. Der Erreger kann auch auf Schokoladen-Agar oder auf PPLO-Medien mit NAD angezüchtet werden. Bis zum Wachstum der Kolonien können 24-48 Stunden vergehen [83]. Zu beachten gilt, dass *H. parasuis* ein Teil der Normalflora des Respirationstraktes beim Schwein sein kann und daher eine Isolierung nicht zwingend auf eine systemische Infektion rückschliessen lässt. Wird *H. parasuis* jedoch aus dem Gehirn und aus den Gelenken isoliert, spricht dies jedoch sicher dafür [81]. Über biochemische Untersuchungen kann *H. parasuis* weiter abgegrenzt werden: *H. parasuis* ist Katalase positiv, Indol und Urease negativ, und kann Galaktose, Glukuronsäure, Mannose, Maltose und Saccharose verstoffwechseln [200]. Eine weitere Typisierung erfolgt im Anschluss an

die Kultivierung mittels Serotypisierung oder auch Genotypisierung (z.B. durch PCR, ERIC-PCR oder Amplifikationsfragment-Längenpolymorphismus (AFLP)-PCR) [21].

Zum Nachweis von Antikörpern gegen *H. parasuis* stehen die Komplementbindungsreaktion [84, 86] und der ELISA [79, 85] zur Verfügung.

Eine weitere Möglichkeit für einen direkten Nachweis von *H. parasuis* stellt die PCR dar [201]. Gut geeignete Untersuchungsmaterialien sind Abstriche von serösen Häuten, Organteile sowie bronchoalveoläre Lavagen. Die von Oliveira et al. (2001) beschriebene PCR, die ein 821 bp-grosses Fragment der 16S rDNA von *H. parasuis* amplifiziert, weist eine grosse Sensitivität auf, zeigt aber Kreuzreaktionen mit *Actinobacillus porcicus*, *A. indolicus* und *A. minor* [201]. Die von Jung et al. (2004) beschriebene hoch sensitive und spezifische nested PCR-Variante wurde für Paraffin-eingebettete Gewebeproben etabliert [202]. Eine weitere PCR, die ebenfalls auf 16S rDNA-Sequenzen beruht, wurde mit einer Spezifität von 100% beschrieben [203]. Die PCR kann z.B. dann eingesetzt werden, wenn die Kultivierung negativ ausfällt, der Verdacht aber weiterhin besteht oder bei kontaminiertem Probenmaterial (Nasen- oder Tonsillentupfer), wenn aufgrund des langsamen Wachstums eine Überwucherung/Überlagerung durch andere Bakterien erfolgt [204]. Ausserdem ist die PCR eine gute Screening Methode, um einzelne Betriebe hinsichtlich einer *H. parasuis*-Problematik zu beurteilen. Mit Hilfe der PCR kann zudem eine Abgrenzung von apathogenen zu pathogenen Isolaten durch den Nachweis von potentiellen Virulenzgenen vorgenommen werden. Ausserdem kommt die PCR für die Bestimmung der Prävalenz z.B. innerhalb einer Herde zum Einsatz [21].

2.4.2.5 Therapie und Prophylaxe

Eine Infektion mit *H. parasuis* kann mit Antibiotika behandelt werden. Die parenterale Antibiotika-Therapie sollte so schnell wie möglich nach Manifestation der Krankheit eingeleitet werden [20]. Während eines Ausbruchs sind hohe Antibiotikadosen von Nöten, damit der Wirkstoff gut in die betroffenen Gelenke und Gewebe sowie in die Cerebrospinalflüssigkeit penetrieren kann [82]. Ausserdem ist zu beachten, dass alle Tiere der jeweiligen Einheit behandelt werden und nicht nur die klinisch erkrankten Tiere. Aufgrund der hohen Ansprüche und der schwierigen Kulturbedingungen wird häufig kein Antibiotogramm erstellt. Der Erreger ist in der Regel empfindlich für Penicillin, Tetracycline, Chloramphenicol, Makrolide, Nitrofurane, Gentamicin, Polymyxin B und Ampicillin [2]. Als Mittel der Wahl wird Penicillin angesehen. Eine Studie aus dem Jahre 2001, die 32 *Haemophilus parasuis* Isolate aus der Schweiz umfasste, zeigte, dass alle empfindlich gegen Penicillin und Enrofloxacin waren. 87% zeigten Resistenzen gegenüber Streptomycin, 50% gegenüber Kanamycin, 41% gegenüber Gentamicin, 3% gegenüber Tetracyclinen, 47% gegenüber Sulfonamiden, 9% gegenüber Trimethoprim und

Sulfonamiden und 17% waren gegenüber Erythromycin resistent [205]. In einer dänischen Studie waren 52 von 80 getesteten *H. parasuis*-Isolate empfindlich gegen Ampicillin, Ceftiofur, Ciprofloxacin, Erythromycin, Florphenicol, Penicillin, Spectinomycin, Tetracyclin, Tiamulin und Tilmicosin. Zehn Isolate wiesen eine reduzierte Empfindlichkeit auf und zwei Isolate waren resistent gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol [16]. San Millan und Mitarbeiter (2006) konnten bei ca. 14% der untersuchten *H. parasuis*-Isolaten Resistenzen gegen Beta-Lactam-Antibiotika nachweisen [238].

Für die Prophylaxe stehen geeignete Hygiene- und Managementmassnahmen an erster Stelle [20, 206]. Andere pathogene Erreger müssen bekämpft, das Absetzalter optimiert, und Tierbewegungen/Umstellungen minimiert werden. Zudem sollte die Durchmischung von Schweinen unterschiedlicher Altersgruppen und Produktionsstufen vermieden werden und Quarantäne-Phasen beim Zukauf eingehalten werden [208].

Eine weitere Möglichkeit einer *H. parasuis* Infektion vorzubeugen ist die Vakzination mittels eines kommerziell erhältlichen oder eines stall-spezifischen Impfstoffes [209, 210]. Der in der Schweiz zugelassene Impfstoff Porcilis Glässer® (Veterinaria AG) basiert auf einem Formalin-inaktivierten *H. parasuis*-Isolat Serotyp 5. Eine belastbare Immunität tritt zwei Wochen nach vollendeter Grundimmunisierung ein. Diese Immunität hält 14 Wochen an. Der Vakzinationszeitpunkt wird in Abhängigkeit von der Persistenz maternaler Antikörper, vom zeitlichen Auftreten klinischer Symptome und vom Betriebsmanagement gewählt [206]. Es besteht die Möglichkeit, Sauen 6-8 Wochen und 2-3 Wochen vor der Geburt zu impfen, um die maternale Immunität zu stärken. Die Ferkel selber werden erst in einem Alter von 5 Wochen zweimal im Abstand von 2 Wochen geimpft [21, 207]. Ein grosses Problem der Impfung gegen *H. parasuis* bleibt die mangelnde Kreuzimmunität und die häufig zu findenden nicht-typisierbaren Isolate [21]. Die verwendete Serotyp 5-Vakzine vermittelt meist nur einen partiellen Schutz gegen heterologe Serotypen [209, 211]. Rapp-Gabrielson und Mitarbeiter (1997) konnten dagegen zeigen, dass eine Impfung mit Sero var 4 sowohl gegen eine homologe Belastungsinfektion als auch gegen eine heterologe Infektion mit Sero var 5 schützt [211].

2.4.3 *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae wurde 1892 von Richard Pfeiffer als erster Vertreter der Gattung *Haemophilus* bei grippekranken Menschen isoliert. Fälschlicherweise wurde *Haemophilus influenzae* lange Zeit für den Erreger der Grippe (Influenza) gehalten, daher auch sein Name [108]. Erst während der grossen Grippe-Pandemie 1918-1919 wurde bemerkt, dass *Haemophilus influenzae* auch bei gesunden Menschen im Speichel nachgewiesen werden konnte und folglich zur Normalflora gehört [109, 111]. Im Jahre 1933 wurde schliesslich das Influenzavirus als Ursache der Grippepandemie entdeckt und das Interesse an *Haemophilus influenzae* nahm ab [111].

2.4.3.1 Identifizierung, Vorkommen, Verbreitung

Bei *Haemophilus influenzae* handelt es sich um ein gramnegatives, fakultativ anaerobes und kleines (1x0.3µm) Stäbchen-Bakterium, welches in die Familie *Pasteurellaceae* einklassiert ist.

Haemophilus influenzae gehört zur Normalflora des oberen Respirationstraktes von Kindern und Erwachsenen [112, 113, 114]. Pittman (1931) konnte aufzeigen, dass *Haemophilus influenzae* in zwei Stämme aufgeteilt werden kann, nämlich einerseits in die S-Stämme, die eine Kapsel besitzen, und andererseits in die R-Stämme, denen eine Kapsel fehlt. Innerhalb der S-Stämme konnten sechs Serotypen, a, b, c, d, e und f differenziert werden [116]. Die Kapsel scheint ein wichtiger Virulenzfaktor zu sein, da die Stämme, die bei gesunden Individuen gefunden werden, meist keine Kapsel besitzen. Im Vergleich hierzu werden bei Menschen, welche an einer Erkrankung wie zum Beispiel Meningitis, Pneumonie, Epiglottitis oder einer eitrigen Arthritis leiden, fast immer bekapselte Stämme von Pittman's Typ b angetroffen [115, 116, 117].

2.4.3.2 Verursachte Krankheiten

Tabelle 3 fasst die Krankheiten, welche die verschiedenen Stämme von *H. influenzae* verursachen können, zusammen.

Stämme	nasopharyngeale Nachweisraten	Manifestation
Bekapselte Stämme, Typ b	2-4%	Meningitis, Epiglottitis, Pneumonie, suppurative Arthritis, Osteitis, Otitis media, Cellulitis, Pericarditis. <i>Meist bei Kindern, häufig mit Bakteriämie auf tretend.</i>
Bekapselte Stämme, andere Typen	1-2%	Selten klinische Manifestation, aber alle 5 Typen können o.g. Krankheitsbilder verursachen
Ohne Kapsel	50-80%	Chronische Bronchitis, Otitis media, Konjunktivitis, Paranasale Sinusitis. <i>Meist erwachsene Patienten, sehr selten mit Bakteriämie</i>

Tabelle 3: Verbreitung und klinische Manifestationen von *H. influenzae* [118].

Bekapselte Stämme, Typ b:

In einer Studie, die 55 Kinder umfasste und über fünf Jahre dauerte, konnte *H. influenzae* Typ b zu gewissen Zeiten bei bis zu 38.5% der Kinder nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 3: 2-4%). Dabei wurden alle drei Monate Tupferproben aus dem Nasenrachenraum entnommen und kultiviert. Sie konnten aus der Untersuchung schliessen, dass Kinder bis zum Alter von fünf Jahren Träger sein können [119]. Ähnliche Resultate erhielten Fothergill und Wright. Sie wiesen ebenfalls bei Kindern bis zum fünften Lebensjahr bakterizide Eigenschaften gegen *H. influenzae* im Blut nach [120].

Die meisten Infektionen mit *H. influenzae* Typ b verlaufen asymptomatisch oder sind begleitet von leichten Symptomen des oberen Respirationstraktes. Kommt es bei Kindern doch zur Erkrankung, dann meist zu einer Meningitis. In den ersten zwei Lebensmonaten verhindern maternale Antikörper das Auftreten einer Meningitis. Die meisten Fälle der Meningitis treten in den ersten zwei Lebensjahren auf, ein Teil kann auch bis zu einem Alter von vier Jahren an Meningitis erkranken [121] oder sogar im Erwachsenenalter [122].

Bekapselte Stämme, andere Typen:

H. influenzae Typ a und c-f können zu den gleichen Erkrankungen wie Typ b führen, sind aber meist apathogen [108]. Es wird angenommen, dass Infektionen mit den Typen a und c zu Sinusitis führen können [123].

H. influenzae, ohne Kapsel:

Nicht bekapselte Stämme von *H. influenzae* sind weit verbreitet (siehe Tabelle 3) und jeder Mensch ist von Zeit zu Zeit Träger dieses Bakteriums [124]. Sie können als Normalflora des Nasenrachenraums des Menschen betrachtet werden. Dennoch sind sie für mehr Krankheitsfälle verantwortlich als der pathogene bekapselte Typ b. Nicht bekapselte Stämme führen zu Krankheiten wie z.B. chronische Bronchitis, Konjunktivitis [108].

2.4.3.3 Virulenzfaktoren

Die Bedeutung der Typ b Kapsel bezüglich ihrer Pathogenität ist bereits seit über 80 Jahren bekannt [125]. Die Kapseln aller sechs bekapselten Stämme von *H. influenzae* bestehen aus Polysacchariden. Die Kapsel des Typ b Stammes jedoch besteht aus Polyribosylribitolphosphat. Hierbei handelt es sich um Zuckerverbindungen in Form von Pentosen. Bei allen anderen sind die Zucker als Hexosen aufgebaut. Mehrere Studien konnten zeigen, dass es sich bei Polyribosylribitolphosphat um einen wichtigen Virulenzfaktor von *H. influenzae* handelt, der die Invasion in den Wirt fördert indem er einen guten Schutz gegen das Komplementsystem des Wirts bietet [108, 127]. Weiter zeichnet sich die Kapsel des Typ b dadurch aus, dass sie die Phagozytose hemmt und somit die Organismen schützt [126].

Fimbrien gelten als weiteren Virulenzfaktor von *H. influenzae*. Sie ermöglichen es dem Erreger sich an Epithelzellen zu adhären und so den Bereich des Nasopharynx zu kolonisieren [108].

Ebenfalls als Virulenzfaktoren angesehen werden IgA-Proteasen [128, 129, 130] und Lipopolysaccharide [131, 132].

2.4.3.4 Diagnose

Die Diagnose kann durch Erreger-Isolierung aus dem Blut erfolgen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Erreger aus dem Sputum zu isolieren. Die Isolierung von *H. influenzae* aus dem Sputum gelingt jedoch nur in etwa der Hälfte der Fälle [165]. Des Weiteren kann der Erreger bei Infektion im Liquor nachgewiesen werden [138].

2.4.3.5 Therapie und Prophylaxe

Erkrankungen, die durch *H. influenzae* verursacht werden, werden mit Antibiotika therapiert. In Studien aus Deutschland konnte gezeigt werden, dass über 90 Prozent der verwendeten Isolate empfindlich auf Aminopenicilline reagierten. Ampicillin-resistente, Betalaktamase-negative Isolate wurden sehr selten isoliert und daher als vernachlässigbar eingestuft. Die Prävalenz von *H. influenzae* Stämmen, welche Betalaktamase produzieren, beträgt weniger als acht Prozent, wobei regionale Unterschiede beobachtet werden konnten [133, 134].

In einer weiteren globalen Studie, welche über 4 Jahre lief, wurden 2702 *H. influenzae* Stämme aus Europa getestet. 16,2% der Stämme produzierten Betalaktamase. 1,7% der Stämme wiesen Resistenzen gegenüber Cefuroxim auf, 3,0% gegenüber Tetracyclin und 10,4% waren gegenüber Clarithromycin resistent. Keine Resistenzen konnten gegenüber den Fluorchinolonen Levofloxacin und Moxifloxacin nachgewiesen werden [135].

Eine weitere Studie aus Europa in den Jahren 2000-2001 umfasste 210 *H. influenzae* Stämme aus Deutschland. 8,1% der Stämme, welche alle Betalaktamase-positiv waren, wiesen Resistenzen gegenüber Ampicillin auf. Gegenüber Cefuroxim, Ciprofloxacin und Levofloxacin konnten keine Resistenzen beobachtet werden. 82,9% der Stämme reagierten sensibel auf Clarithromycin [136].

Als wichtigste Prophylaxe-Massnahme wird die Impfung angesehen. Es stehen verschiedene Impfstoffe zur Verfügung: Polysaccharid-Impfstoffe und konjugierte Impfstoffe.

In den siebziger Jahren wurden gereinigte Polyribosylribitolphosphat-Polysaccharide (PRP, Kapselbestandteil) in Finnland und den Vereinigten Staaten als Impfstoff zur Evaluation eingesetzt. Bei ganz kleinen Kindern waren sie nicht wirksam. Wurden die Kinder jedoch erst nach Erreichen des 18. Lebensmonates geimpft konnte mit einem 90-prozentigen Schutz gerechnet werden. Nach der Markteinführung dieses Impfstoffs 1985 in den USA wurden Untersuchungen durchgeführt. Diese zeigten viele Misserfolge [137]. In der Schweiz wurde dieser Impfstoff aufgrund seiner eingeschränkten Wirksamkeit nie registriert [138].

Die Konjugation des Antigens mit einem Trägerprotein (konjugierte Impfstoffe) ermöglicht es Impfstoffe herzustellen, welche eine Immunantwort auslösen und früher zu einer besseren Antikörperproduktion führen. Mit drei solcher konjugierten Impfstoffe wurden prospektive Studien durchgeführt, welche sich mit derer Wirksamkeit befassten. Tabelle 4 fasst diese zusammen [138].

Impfstoff	Impfschema	Wirksamkeit, % (95%-CI)	Referenz
PRP-D	3 Dosen und Booster. Kinder im Alter von 3, 4, 6 und 14 Monaten in Finnland	94 (83-98)	139
PRP-D	3 Dosen. Eskimo-Kinder im Alter von 2, 4 und 6 Monaten	33 (-57-73)	137
PRP-OMP	2 Dosen. Navajo-Kinder im Alter von 2 und 4 Monaten	95 (72-99)	140
HbOC	3 Dosen. Kinder in Kalifornien im Alter von 2, 4 und 6 Monaten	100 (64-100)	141

Tabelle 4: Die wichtigsten Studien zur Wirksamkeit der konjugierten Impfstoffe [138]

In der Schweiz sind drei Impfstoffe erhältlich. Ihre Impfschemata variieren aufgrund der Daten über ihre Wirksamkeit. Wurde bei einem Kind der optimale Zeitpunkt für die Impfung verpasst, kann mit den jeweiligen Impfstoffen und den zugehörigen Impfschemata dennoch ein genügender Schutz erreicht werden. Kinder ab einem Alter von 15 Monaten benötigen nur eine Dosis eines konjugierten Impfstoffs, da ihr Immunsystem in der Entwicklung bereits fortgeschrittenen ist. Eine Zusammenfassung über die Impfschemata der drei in der Schweiz erhältlichen Impfstoffe ist in Tabelle 5 aufgeführt [138].

Produkt	Alter bei der Erstimpfung (in Monaten)	Basisimpfung	Rappel
PRP-D	4-11	2 Dosen im Abstand von 2 Monaten	15 Monate
	12-14	1 Dosis	15 Monate
	15-59	1 Dosis	
PRP-OMP	2-11	2 Dosen im Abstand von 2 Monaten	15 Monate
	12-14	1 Dosis	15 Monate
	15-59	1 Dosis	
HbOC	2-6	3 Dosen im Abstand von 2 Monaten	15 Monate
	7-11	2 Dosen im Abstand von 2 Monaten	15 Monate
	12-14	1 Dosis	15 Monate
	15-59	1 Dosis	

Tabelle 5: Schema für die *Haemophilus influenzae*-Impfung in Abhängigkeit vom Alter [138]

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienisolate

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienisolate sind in Tabelle 6 aufgeführt. Sie stammen aus der Stammsammlung des Instituts für Veterinärbakteriologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich und wurden in den Jahren 1974 bis 1998 im Rahmen der Routinediagnostik gesammelt und asserviert. Alle Bakterienisolate lagen in lyophilisierter Form (Lyophilisate) vor. Die Auswahl erfolgte aufgrund der während der Routinediagnostik vorgenommenen Einklassifizierung in die Gattung „*Haemophilus*“. Die Tabelle 24 im Anhang umfasst alle erprobten Lyophilisate.

3.1.1 Lyophilisate

Die lyophilisierten Bakterienisolate (Tabelle 6) wurden durch die Zugabe von sterilem Wasser als Lösungsmittel reaktiviert.

Nummer	Beschriftung Lyophilisat	Datum
6	469/49	
15	HSSK M 677/Milch	November 1998
16	HSSK M 677/HSSB	November 1998
19	HSSK 8025/Milch	November 1998
20	HSSK 8025/HSSB	November 1998
135	<i>H. somnus</i> , WK, 413/76, HO	Februar 78
136	<i>H. somnus</i> , WK, 113/1/81, CO2	26.02.81
137	<i>H. somnus</i> , H. Agni, WK, 407/80	20.08.80
138	<i>H. somnus</i> , M 677, CO2	01.10.80
139	<i>H. somnus</i> , WK, 400/74, MO	Februar 78
142	<i>H. somnus</i> , FS, 592/78, HO	30.03.78
143	<i>H. somnus</i> , FS, 326, CO2	30.04.75
144	<i>H. somnus</i> , FS, 554/79, CO2	27.03.79
149	<i>H. somnus</i> , WK, 355/78, CO2	April 76
150	<i>H. somnus</i> , WK, 46/75, CO2	15.10.80
152	<i>H. somnus</i> , FS, 1335/78, CO2	04.08.78
164	<i>H. somnus</i> , FS, 2361/78	12.01.79
172	<i>H. somnus</i> , WK, 487/78, CO2	07.78
174	<i>H. somnus</i> , 469/38	

175	<i>H. somnus</i> , WK, 275/76, CO2	14.02.78
176	<i>H. somnus</i> , 469/6	
177	<i>H. somnus</i> , WK, 278/78, CO2	24.04.79
178	<i>H. somnus</i> , WK, 516/74-2, CO2	28.10.74
179	<i>H. somnus</i> , W, 587, CO2	16.12.74
180	<i>H. somnus</i> , FS, 492/78, CO2	12.11.80
186	<i>H. somnus</i> , W, 271, CO2	16.12.74
191	<i>H. somnus</i> , FS, 61/78, CO2	17.01.78
192	<i>H. somnus</i> , WK, 400/74, CO2	14.02.75
194	<i>H. somnus</i> , HS-WK, 279/78	06.04.78

Tabelle 6: Lyophilisate

H. und Haem. stehen als Abkürzung für *Haemophilus/Histophilus*. Die Nummern, mit denen die Lyophilisate bezeichnet waren entsprechen den Diagnostik-Nummern aus der Routinediagnostik. CO2 steht für Kohlendioxid, Wdk für Wiederkäuer.

Da die Vertreter der Gattung *Haemophilus* aufgrund ihrer Anpassung an eine parasitäre Lebensweise hohe Ansprüche an Nährmedien stellen [2] wurden nachfolgend aufgeführte Nährmedien ausgewählt.

3.1.2 Nährmedien

Columbia-Agar mit Schafblut:

Schafblut-haltiger kommerzieller universeller Columbia-Nährboden für die Isolierung und Kultivierung anspruchsvoller Keime. Die Beurteilung von Hämolyseformen wird ermöglicht.

Hersteller: Oxoid, Pratteln, Schweiz.

Schokoladen-Agar (Kochblut-Agar):

Kommerzieller Nährboden. Es handelt sich um eine Variante des Columbia-Agar mit Schafblut, bei der eine Lyse der Erythrozyten durch kurzzeitige Erhitzung erreicht wird. Dadurch werden Faktoren wie Hämin und NAD aus den Erythrozyten freigesetzt. Durch die Zugabe des Wachstumssupplement Vitox eignet sich Kochblut-Agar besonders für die Anzucht sehr anspruchsvoller Keime

Hersteller: Oxoid, Pratteln, Schweiz.

TSB (Trypticase Soy Broth):

Ein flüssiges Universal-Anreicherungsmedium zur nicht-selektiven Anreicherung von Bakterien. Das Medium wird direkt mit dem Untersuchungsmaterial beimpft und 24-48 Stunden bei 37°C bebrütet. Wird das Medium trüb, bedeutet dies, dass Bakterien gewachsen sind. Keine Trübung schliesst ein Wachstum jedoch nicht aus. Die Anreicherungskultur wird anschliessend auf Nährböden ausgestrichen oder direkt für alternative Nachweismethoden eingesetzt.

Hersteller: Oxoid, Pratteln, Schweiz.

3.2 Mikroskopische Visualisierung: Gram-Färbung

3.2.1 Reagenzien und Lösungen

In Tabelle 7 sind die verwendeten Materialien für die Gram-Färbung aufgeführt.

Lösungen	Hersteller
Kristallviolett (COLOR GRAM 2 R1-F)	bio Mérieux®, Genf, CH
Stabilisierte Lugol-PVP-Lösung (COLOR GRAM 2 R2-F)	bio Mérieux®, Genf, CH
Safranin-Lösung (COLOR GRAM 2 R4-F)	bio Mérieux®, Genf, CH
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs-CH

Tabelle 7: Reagenzien und Lösungen

3.2.2 Durchführung

Material aus einer Bakterienkolonie wurde mit einer Öse entnommen und auf einem Objektträger in NaCl-Lösung suspendiert bis die Suspension homogen milchig trüb war. Der Objektträger wurde an der Luft getrocknet. Anschliessend wurde das Präparat mehrmals kurz durch die Bunsenbrennerflamme gezogen und somit hitzefixiert. Nun

wurde das Präparat auf der Färbefarbank mit Kristallviolett-Lösung 3 min gefärbt. Nach dem Abgiessen der Farblösung wurde das Präparat mit Lugolscher-Lösung bedeckt und für weitere zwei Minuten gefärbt. Ein erneutes Abgiessen der Farbe folgte. Anschliessend wurde in einer Küvette mit absolutem Ethanol entfärbt. Durch die Behandlung mit Lugol'scher Lösung entstehen Farbstoff-Iod-Komplexe in den Bakterien, die aus gramnegativen Bakterien durch Behandlung mit Ethanol extrahiert werden können. Wegen der dickeren Peptidoglykan-Schicht werden die Komplexe dagegen aus grampositiven Bakterien auch mit Alkohol nicht entfernt. Der Prozess der Entfärbung wurde durch das Abspülen des Präparates mit Wasser gestoppt. Für die Gegenfärbung, die 15 Sekunden dauerte, wurde Safarin verwendet. Safarin färbt durch Alkohol entfärbte, gram-negative Bakterien an und lässt sie somit durchgängig rot erscheinen, grampositive Bakterien sind violett gefärbt. Der Objektträger wurde abschliessend mit Wasser abgespült und getrocknet. Das Präparat wurde im Mikroskop bei 1000-facher Vergrösserung mit einem Tropfen Immersionsöl begutachtet und das Gram-Verhalten beurteilt. Abbildung 3 zeigt *H. influenzae* als Beispiel gramnegativer Stäbchenbakterien [www.k8science.org/hot-topics/images/flu-041028.gif].

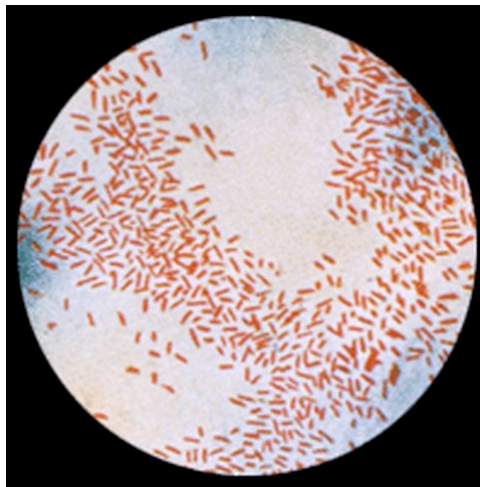


Abbildung 3: Gram-Färbung von *Haemophilus influenzae* [www.k8science.org/hot-topics/images/flu-041028.gif]

3.3 Aufarbeitung des Probenmaterials für die PCR

Die Proben für die PCR wurden auf zwei verschiedene Arten aufgearbeitet.

3.3.1 DNA-Extraktion mit Phenol/Chloroform

In Tabelle 8 sind die verwendeten Lösungen für die DNA-Extraktion aufgelistet.

Puffer und Reagenzien	Hersteller, Zusammensetzung	Konzentration
TEN-Puffer	Tris / HCL, pH 7.4, Fa. Biosolve,	10 mM
	Valkenswaard, Niederlande	
	EDTA, Sigma-Aldrich, Buchs, CH	10 mM
	NaCl Sigma-Aldrich, Buchs, CH	1 M
SDS	Sigma-Aldrich, Buchs, CH	10%
Proteinase K	Roche, Rotkreuz, CH	20 mg/ml
Phenol	TE-gesättigt, Rotiphenol®, Roth-AG, Reinach, CH	-
IAC	1 Teil Isoamylalkohol und 24 Teile Chloroform Sigma-Aldrich, Buchs, CH	-
Natriumacetat-Lösung	pH 5.2, Sigma-Aldrich, Buchs, CH	3 M
Ethanol	Sigma-Aldrich, Buchs, CH	-

Tabelle 8: Puffer und Reagenzien

Zu jeweils 400 µl der in sterilem Wasser aufgelösten Lyophilisate wurden 22,5 µl TEN-Puffer, 45 µl SDS und 10 µl Proteinase K hinzugefügt und für zwei Stunden im Wasserbad bei 56°C oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde zu den Proben 400 µl Phenol gegeben. Durch Invertieren (100 Mal) der Reaktionsgefässe wurden die zwei Lösungen vermischt und anschliessend 20 Minuten auf Eis gekühlt. Es folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 12.000 x g und Raumtemperatur, bei welcher sich zwei Phasen bildeten. Die obere wässrige Phase, in der sich die DNA befand, wurde mittels einer abgeschnittenen Spitze vorsichtig entnommen, in ein neues Reaktionsgefäss überführt und die Phenolextraktion wurde wiederholt. Anschliessend wurden 400 µl Chloroform-

Isoamylalkohol-Gemisch (IAC) hinzugefügt und der Reaktionsansatz durch 20 maliges Kippen des Gefässes vermischt. Danach wurde zentrifugiert (12.000 x g) und der Überstand mit abgeschnittenen Spitzen entnommen. Der IAC-Schritt wurde wiederholt, um die DNA von Phenolresten zu befreien. Die DNA wurde aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1/10 Probenvolumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und dem doppelten Volumen eines eiskalten, 96%igen Ethanol für 30 Minuten bei -70°C gefällt. Die gefällte DNA wurde 30 min lang bei 4°C und 17.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet mit 200 µl eiskaltem, 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschliessend getrocknet. Abschliessend wurde das DNA-Pellet in 20 µl Aqua dest. resuspendiert.

3.3.2 Lyse der Bakterien zur DNA-Gewinnung

Bei der sogenannten Kochlyse wird innerhalb kurzer Zeit DNA freigesetzt. Es wurde eine Bakterienkolonie von Nährbodenplatten entnommen und in 50 µl Wasser suspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschliessend für 10 Minuten in einem 100°C warmen Wasserbad gekocht und danach für 10 Minuten abzentrifugiert. Die freigesetzte DNA befand sich im Überstand, der direkt für die PCR verwendet werden konnte.

3.4 Polymerase-Kettenreaktion, PCR

3.4.1 Lösungen und Reagenzien

Tabelle 9 zeigt die für die PCR verwendeten Reagenzien.

Reagenzien	Hersteller
Primer	Synthese durch MWG Eurofins, Ebersberg, D
Polymerase-Mix: Hot Start Taq® Master Mix Kit	Qiagen, Hombrechtikon, CH

Tabelle 9: Lösungen und Reagenzien, PCR

3.4.2 PCR zur Amplifizierung des 16s rRNA-Gens

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler mit folgendem Ansatz durchgeführt:

12,5 µl Hot Start Taq Master-Mix, 0,2 µl Primer 1492R (100 pmol/µl), 0,2 µl Primer 27F (100 pmol/µl), 10,1 µl A. bidest. und 2,0 µl Probenmaterial (Template) bzw. Wasser (als Negativkontrolle). Das ergab einen Ansatz von 25,0 µl.

In Tabelle 10 ist das verwendete Protokoll zusammengefasst. Tabelle 11 zeigt eine Übersicht der verwendeten Primer.

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit	Schritte
1	95°C	15 min	Denaturierung der DNA, Aktivierung der Polymerase
30-35	95°C	30 sec	Denaturierung
	55°C	30 sec	Primerhybridisierung
	72°C	45 sec	Elongation
1	72°C	10 min	Elongation
-	4°C	∞	Kühlung der PCR-Produkte

Tabelle 10: PCR-Protokoll

Name	Nukleotid-Sequenz (5´-3´)	Amplifikat- grösse	Annealing- Temperatur	Zyklen- zahl
1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	1600 bp	55°C	30
27F	CAGAGTTTGATCCTGGCTCAG			

Tabelle 11: Verwendete Primer

3.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

3.5.1 Lösungen und Reagenzien

Aus der Tabelle 12 werden die Materialien für die Agarosegel-Elektrophorese ersichtlich.

Puffer und Reagenzien	Hersteller	Konzentration
Agarose	Eurobio, Les Ulis, Frankreich	-
TAE-Puffer (50x)	Tris, Biosolve, Valkenswaard, Niederlande EDTA, Sigma-Aldrich, Buchs, CH Essigsäure, Rotipuran®, Roth AG, Arlesheim, CH pH-Wert auf 7,6 einstellen und Lösung autoklavieren	2 M 50 mM 1 M
Ethidiumbromid	E. Merck (Schweiz) AG, Dietikon, CH	1%ige Lösung in Wasser
DNA-Standard (1 kb-Ladder)	New England Biolabs, Bioconcept, Allschwil, CH	-
Auftragspuffer	Gel Loading Dye Blue, New England Biolabs, Bioconcept, Allschwil, CH	-

Tabelle 12: Lösungen und Reagenzien

3.5.2 Agarosegel-Elektrophorese

Für die Herstellung eines 1%igen Gels wurde die benötigte Menge Agarose in 1x TAE-Puffer (1 g Agarose/ 100 ml TAE-Puffer) durch Aufkochen gelöst und anschliessend unter Rühren auf 50°C abgekühlt. Pro 100 ml Agarose-Gel wurden 3 µl Ethidiumbromid dazugegeben. Das noch flüssige Gemisch wurde in einen Gelträger mit eingesetztem Kunststoff-Kamm zur Erzeugung der Probenaschen gegossen. Der ausgehärteten Gelmatrix wurde der Kamm entfernt. Das Agarosegel auf dem Gelträger wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Als Laufpuffer diente der 1xTAE-Puffer.

Nach Beendigung des Thermocycler-Programms wurden 5 µl des PCR-Ansatzes mit 1 µl Auftragspuffer gemischt und in die Probenaschen pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 75 Volt über 40 Minuten. Zur Bestimmung der Amplifikatgrösse wurde ein 1kb-

DNA-Längenstandard („1kb-Ladder“) verwendet. Die Ergebnisse wurden mittels UV-Licht-Fotografie dokumentiert.

3.5.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Verwendetes Kit: QIAquick® PCR Purification Kit (50)

Hersteller: QIAGEN GmbH, Hombrechtikon, CH

Mit Hilfe des PCR-Purification Kits wurden die PCR-Produkte aus einem 25 µl Ansatz nach der Anleitung des Herstellers aufgereinigt und anschliessend direkt für die Sequenzierung verwendet.

3.5.4 DNA-Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der 16S-rDNA Amplifikate wurde von 4base-lab® in Reutlingen, Deutschland, durchgeführt. Ausgewertet wurden die erhaltenen Nukleotidsequenzen mit Hilfe des Fasta-Algorithmus (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/nucleotide.html>), wobei die DNA-Sequenzen mit entsprechenden Sequenzen in der Datenbank verglichen wurden. Die DNA-Sequenzen der 28 *Haemophilus somnus* Stämme wurden anschliessend auf ihre Homologie hin verglichen (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/).

3.6 Testen der Faktorenabhängigkeit

Beim X- und V-Faktor handelt es sich um Wachstumsfaktoren aus dem Blut, welche im Zusammenhang mit der Gattung *Haemophilus* eine wichtige Rolle spielen. Früher galt die Abhängigkeit von einem der Faktoren sogar als Gattungskriterium (12, 18 157). Der X-Faktor, das Hämin, wird aus Erythrozyten freigesetzt. Der V-Faktor oder das Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD) ist auch im Blut vorhanden wird jedoch erst nach dessen Erhitzung freigesetzt. Tabelle 13 fasst die verwendeten Testplättchen zusammen.

Testplättchen	Hersteller
77148 X-Factor Disks	Fluka Production GmbH, Buchs/Schweiz
89788 V-Factor Disks	Fluka Production GmbH, Buchs/Schweiz

Tabelle 13: Testplättchen

Um die Abhängigkeit der einzelnen Stämme von den Faktoren X und V zu testen wurden Blutplatten verwendet, die mit den jeweiligen Isolaten beimpft wurden. Anschliessend wurden mit X- und V-Faktor imprägnierte Plättchen auf die inokulierte Region gegeben. Je

nach Wachstumsverhalten der Bakterienisolate, nahe des X- oder V-Faktor Plättchens, konnte die Abhängigkeit beschrieben werden. Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit vom X- und vom V-Faktor von *H. influenzae*. Das Wachstum kann nur rund um das Plättchen, welches mit X- und V-Faktor imprägniert wurde, beobachtet werden. Folglich ist *H. influenzae* von beiden Wachstumsfaktoren abhängig [<http://web.indstate.edu/thcme/micro/haemophXV.jpg>].

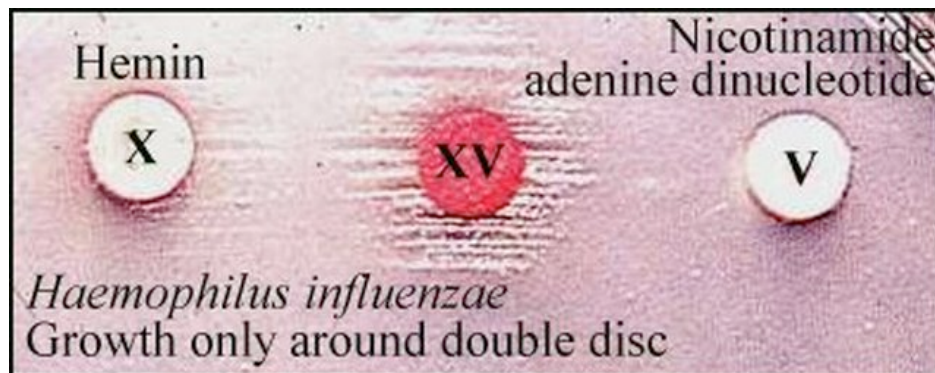


Abbildung 4: Faktoren-Abhängigkeit von *H. influenzae*
[<http://web.indstate.edu/thcme/micro/haemophXV.jpg>]

3.7 Vermehrung der Bakterien in grösseren Volumina

TSB: BBL™ Trypticase™ Soy Broth (Soybean-Casein Digest Broth),
Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152 USA, 38800
Le Pont de Claix, France

Für die weiteren Arbeiten (DNA-Extraktion, PCR, Sequenzierung, Ribotypisierung) wurden die hämophilen Bakterienisolate in zwei Liter TSB vermehrt. Die Zusammensetzung des Nährmediums ist in Tabelle 14 zusammengefasst. Es wurden 60 Gramm des Pulvers in zwei Litern destilliertem Wasser aufgelöst und gut gemischt. Damit das Pulver vollständig in Lösung ging musste das Wasser erwärmt werden. Anschliessend wurde das Flüssigmedium 15 Minuten lang bei 121°C autoklaviert, abgekühlt und danach mit Bakterien beimpft. Die beimpften Lösungen wurden anschliessend für zwei Tage bei 37 °C bebrütet. Anschliessend wurden die Flüssigkulturen in 50-ml-Röhrchen zentrifugiert (500 x g, 10 Minuten). Die Überstände wurden verworfen und die Bakterienpellets in jeweils 5 ml A. bidest. resuspendiert. Diese 5 ml Bakteriensuspensionen wurden jeweils in 1,5-ml Reaktionsgefässe à 400 µl aufgeteilt und die DNA wie in Punkt 5.4.1 mit Phenol/Chloroform extrahiert.

Inhaltsstoffe	Konzentration
Pankreatisch abgebautes Casein	17,0 g/l
Papainisch abgebautes Soja	3,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Dikaliumphosphat	2,5 g/l
Dextrose	2,5 g/l

Tabelle 14: Zusammensetzung pro Liter TSB-Medium

3.8 DNA-Verdau

Tabelle 15 zeigt die verwendeten Puffer und Enzyme.

Reagenzien	Hersteller
SURE/Cut Buffer H for Restriction Enzymes	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, CH
<i>EcoRI</i>	Roche Diagnostics GmbH, Rotkreuz, CH

Tabelle 15: Puffer und Enzyme

Der Restriktionsenzymverdau wurde in einem 500 µl Ansatz durchgeführt. Dabei wurden zu 50 µl DNA 50 µl Puffer H, 5 µl *EcoRI* und 395 µl Wasser hinzugefügt. Die Probe wurde für zwei Tage im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschliessend durch Zugabe von 1/10 Probenvolumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und dem doppelten Volumen eines eiskalten, 96%igen Ethanol für 30 Minuten bei -70°C gefällt. Die gefällte DNA wurde 30 Minuten lang bei 4°C und 15.000 U/min zentrifugiert und somit pelletiert. Der Überstand wurde abgekippt. Das zurückgebliebene Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem, 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und anschliessend getrocknet. Abschliessend wurde das DNA-Pellet in 20 µl Aqua dest gelöst und mit Hilfe der Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem 0.8 %igen Agarose-Gel mittels Gel-Elektrophorese über Nacht.

3.9 Southern Blot

3.9.1 Puffer, Lösungen und weitere Materialien

In Tabelle 16 sind die verwendeten Materialien zusammengefasst.

Reagenzien/Materialien	Zusammensetzung	Hersteller
Depurinationspuffer	0,25 N HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Denaturierungslösung	0,50 N NaOH 1,50 M NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Aqua dest	-	Laboratorium Dr. G. Bichsel AG Interlaken
Transferlösung	0,25 N NaOH 1,50 M NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Waschlösung	2× SSC, pH 7.0 0,30 M NaCl 0,03 M Natriumcitrat	Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Chromatographie-Filterpapier	3 mm	Ederol
Nylonmembran	-	Hybona™-N+, Amersham Biosciences

Tabelle 16: Reagenzien, Materialien (Blot)

3.9.2 Durchführung

Die DNA wurde nach dem Restriktionsenzymverdau im Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Das Gel wurde anschliessend 2 Mal 5 min mit Depurinationspuffer und 3 Mal 5 min mit deionisiertem Wasser gewaschen. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel in der Denaturierungslösung 30 Minuten lang geschüttelt. Anschliessend wurde die denaturierte (einzelnsträngige) DNA mittels kapillaren Sogs auf eine Nylonmembran transferiert („geblottet“). Durch den kapillaren Sog wurden die DNA-Banden mit der Transferlösung auf die Nylonmembran übertragen. Die Transferdauer betrug 12 bis 16 Stunden. Danach wurde die Membran 3 Mal 5 min mit 2×SSC gewaschen und anschliessend zwischen zwei Filterpapieren luftgetrocknet. Die Membranen konnten für die Hybridisierungsreaktionen weiterverwendet werden.

3.10 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde durchgeführt.

3.10.1 Reagenzien und Puffer

Lösungen	Zusammensetzung/Hersteller
DIG-Easy-Hyb-Lösung	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
Waschlösung 1	2×SSC, 0,1% SDS SSC: Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Waschlösung 2	0,1×SSC, 0,1% SDS SSC: Eppendorf AG, Hamburg, Germany
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl
Blockingpuffer	Blockingreagenz (Roche-Diagnostics, Rotkreuz, CH) in Maleinsäure-Puffer
Alkalische Phosphatase-konjugierte anti-Digoxigenin-Antikörper	Verdünnung 1:5000 in Maleinsäurepuffer
Detektionspuffer	100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl
Farbsubstratlösung	200 µl Substrat in 10 ml Detektionspuffer

Tabelle 17: Reagenzien und Puffer zur Hybridisierung

3.10.2 Nicht-radioaktive Markierung von DNA mit Digoxigenin

Mittels DNA Labeling and Detection Kit, Roche Diagnostics, Rotkreuz, CH wurde Plasmid-DNA pkk3535 DIG-markiert. Das Plasmid pkk3535 enthält das RNA Operon von *E. coli* [229]. Vor der Markierung wurde die DNA (ca. 1 µg in 15 µl) durch 10 minütiges Kochen denaturiert und anschliessend auf Eis gekühlt. Es wurden 2 µl Hexanukleotidgemisch, 2 µl dNTP-Gemisch und 1 µl Klenow-Enzym zu den 15 µl DNA pipettiert und 19 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA-Lösung beendet. Die Reinigung der markierten DNA von nicht eingebauten Mono- und Hexanukleotiden wurde mit Hilfe des Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen, Hombrechtikon, CH) durchgeführt.

3.10.3 Hybridisierungsreaktion und –detektion

Die Nylonmembran wurde zur Prähybridisierung mit 8 ml DIG-Easy-Hyb-Lösung (Roche-Diagnostics, Rotkreuz, CH) unter Schütteln für 30 min bei 37°C inkubiert. Die DNA-Sonde wurde 10 Minuten bei 95°C denaturiert und mit 14 ml DIG-Easy-Hyb-Lösung versetzt. Dann wurde die Nylonmembran mit der Hybridisierungslösung bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler hybridisiert.

Zur Entfernung unspezifisch gebundener, markierter DNA wurde die Membran 2× 5 min in Waschlösung 1 bei Raumtemperatur und 2× 20 Minuten bei 62°C mit Waschlösung 2 gewaschen. Anschliessend wurde in Maleinsäurepuffer äquilibriert und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 100 ml Blockingpuffer geblockt. Nach kurzem Waschen in Maleinsäurepuffer wurde die Membran mit einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper für 30 min inkubiert (Verdünnung 1:5000 in Maleinsäurepuffer). Anschliessend wurde 2× 15 Minuten mit Maleinsäurepuffer gewaschen, kurz in Detektionspuffer äquilibriert und die Farbsubstratlösung dazugegeben. Durch die alkalische Phosphatase wurden die beiden Substrate in ein blaurötliches Präzipitat auf der Membran (an der Stelle der Hybridisierung) umgesetzt, welches schlussendlich visuell ausgewertet werden konnte. Die Farbreaktion wurde durch 5 minütiges Waschen in Aqua dest gestoppt.

4 Ergebnisse

4.1 Schematische Darstellung des Untersuchungsgangs

Um die hämophilen Bakterien-Isolate aus der diagnostischen Stammsammlung des Instituts für Veterinärbakteriologie zu typisieren, wurde das in Abbildung 5 schematisch dargestellte Untersuchungsschema angewendet.

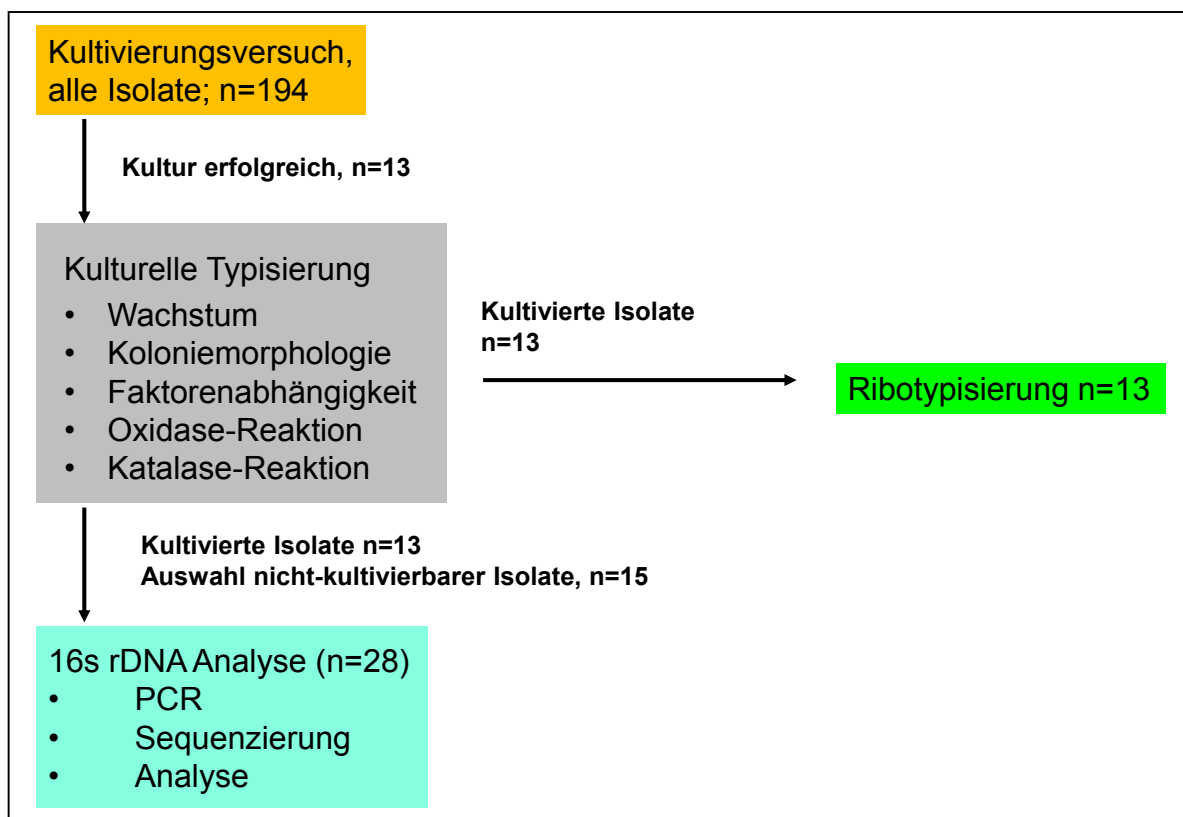


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Typisierungsschemas

4.2 Kulturelle Typisierung der haemophilen Diagnostikisolate

Untersucht wurden Isolate aus der diagnostischen Stammsammlung des Instituts für Veterinärbakteriologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich aus den Jahren 1974 bis 1998. Auswahlkriterium für die Isolate war der im Rahmen der Routinediagnostik erhobene Befund: „haemophile Bakterienspezies“. Dabei handelte es sich ausschliesslich um diagnostische Isolate aus Wiederkäuern, die aufgrund ihres Wachstumsverhaltens, ihrer Morphologie und ihrer biochemischen Charakteristika den beiden Spezies *Haemophilus somnus* und *Histophilus agni* zugeordnet worden waren. Insgesamt konnten dreizehn haemophile Bakterienisolate erfolgreich angezüchtet werden. Tabelle 18 gibt einen Überblick über das Wachstumsverhalten und die Koloniemorphologie der verwendeten Bakterienisolate. Alle Isolate zeigten keine Hämolyse und waren Oxidase-positiv und Katalase-negativ. Weiterhin wurden Subkulturen auf Blut- und Schokoladenagar mit X- und V-Faktorplättchen angelegt. Dabei zeigte sich bei keinem der Isolate ein Faktoren-abhängiges Wachstum. Alle Isolate zeigten ein deutlich besseres Wachstum bei 5% CO₂.

Für haemophile Bakterien werden unterschiedliche Kolonieformen mit definierten Morphologien beschrieben. Dabei unterscheidet man M- (mukoid), S- (smooth) oder R- (rough) Formen [91]. Die in dieser Arbeit verwendeten haemophilen Bakterienisolate wurden anhand ihrer Koloniemorphologie zugeordnet. Sechs Isolate wurden als M-Form klassifiziert, vier Isolate der S-Form und drei Isolate der R-Form zugeordnet. Die Zuordnung ist in Tabelle 19 zusammengefasst.

Isolat-Nummer	Wachstum	Koloniemorphologie	Hämolysse	V-Faktor-/X-Faktor- Abhängigkeit	Oxidase-Reaktion	Katalase-Reaktion
6	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	Ja	Kleine feine gelbliche bis gräuliche Kolonien, nicht konfluierend, einzeln liegend	neg.	neg.	pos.	neg.
16	Ja	Kleine feine gelbliche bis gräuliche Kolonien, nicht konfluierend, einzeln liegend	neg.	neg.	pos.	neg.
19	Ja	Kleine feine gelbliche bis gräuliche Kolonien, nicht konfluierend, einzeln liegend	neg.	neg.	pos.	neg.
20	Ja	Gelbliche Kolonien; sternförmig- auslaufende Kolonie- Ränder	neg.	neg.	pos.	neg.

Isolat-Nummer	Wachstum	Koloniemorphologie	Hämolyse	V-Faktor-/X-Faktor- Abhängigkeit	Oxidase-Reaktion	Katalase-Reaktion
135	Nein	-	-	-	-	-
136	Ja	Kolonien, die miteinander verschmelzen, trübes mukoides Aussehen, glänzend	neg.	neg.	pos.	neg.
137	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
138	Ja	Kolonien mit gezackten Rändern	neg.	neg.	pos.	neg.
139	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
142	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
143	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
144	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
149	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
150	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
152	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
164	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Isolat-Nummer	Wachstum	Koloniemorphologie	Hämolyse	V-Faktor-/X-Faktor- Abhängigkeit	Oxidase-Reaktion	Katalase-Reaktion
172	Ja	Kleine feine gelbliche bis gräuliche Kolonien, nicht konfluierend, einzeln liegend	neg.	neg.	pos.	neg.
174	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
175	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
176	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
177	Ja	Gelblich-gräuliche Kolonien, trübes mukoide, glänzend	neg.	neg.	pos.	neg.
178	Ja	Gelblich-gräuliche Kolonien, die miteinander verschmelzen, trübes mukoides Aussehen, glänzend	neg.	neg.	pos.	n.d.

Isolat-Nummer	Wachstum	Koloniemorphologie	Hämolyse	V-Faktor-/X-Faktor- Abhängigkeit	Oxidase-Reaktion	Katalase-Reaktion
179	Ja	Kleine feine gelbliche bis gräuliche Kolonien, nicht konfluierend, einzeln liegend	neg.	neg.	pos.	neg.
180	Nein	-	-	-	-	-
186	Ja	Gelblich-gräuliche Kolonien, die miteinander verschmelzen, trübes mukoides Aussehen, glänzend	neg.	neg.	pos.	neg.
191	Ja	Gelblich-gräuliche Kolonien, mukoid- glänzend	neg.	neg.	pos.	neg.
192	Ja	Gelblich-gräuliche Kolonien, mukoid- glänzend	neg.	neg.	pos.	neg.
194	Nein	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 18: Phänotypische Charakterisierung der haemophilen Bakterienisolate

Kolonieform	Morphologie [91]	Isolate
M-Form (mukoid)	gross, trüb, konfluierend und schleimig; glänzende Oberfläche	136, 177, 178, 186, 191, 192
S-Form (smooth)	klein, nicht konfluierend und fein	15, 16, 19, 172
R-Form (rough)	gross mit teils gezackten Rändern	20, 138, 179

Tabelle 19: Kolonieformen

4.3 16S rDNA-Typisierung der haemophilen Diagnostikisolate

Zur weiteren Typisierung ausgewählter haemophiler diagnostischer Bakterienisolate (n=28), wurde eine 16S rDNA PCR durchgeführt. 16S DNA-typisiert wurden alle erfolgreich kultivierten Isolate (n=13) und eine zufällige Auswahl der nicht-kultivierbaren Isolate (n=15). Aus den Isolaten und den rekonstituierten Lyophilisaten konnten Amplifikate mit einer Grösse von ca. 1400 bp nachgewiesen werden (Abbildung 6).

Die Amplifikate wurden sequenziert und die Sequenzen mittels FASTA Algorithmus (SSEARCH FASTA - European Bioinformatics Institute) mit Datenbankeinträgen verglichen. Die FASTA Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Insgesamt zeigten alle untersuchten Bakterienisolate die höchste Übereinstimmung mit *Histophilus somni*. Die Übereinstimmungswerte lagen zwischen 99,1% (Isolat 135) und 72,3% (Isolat 191).

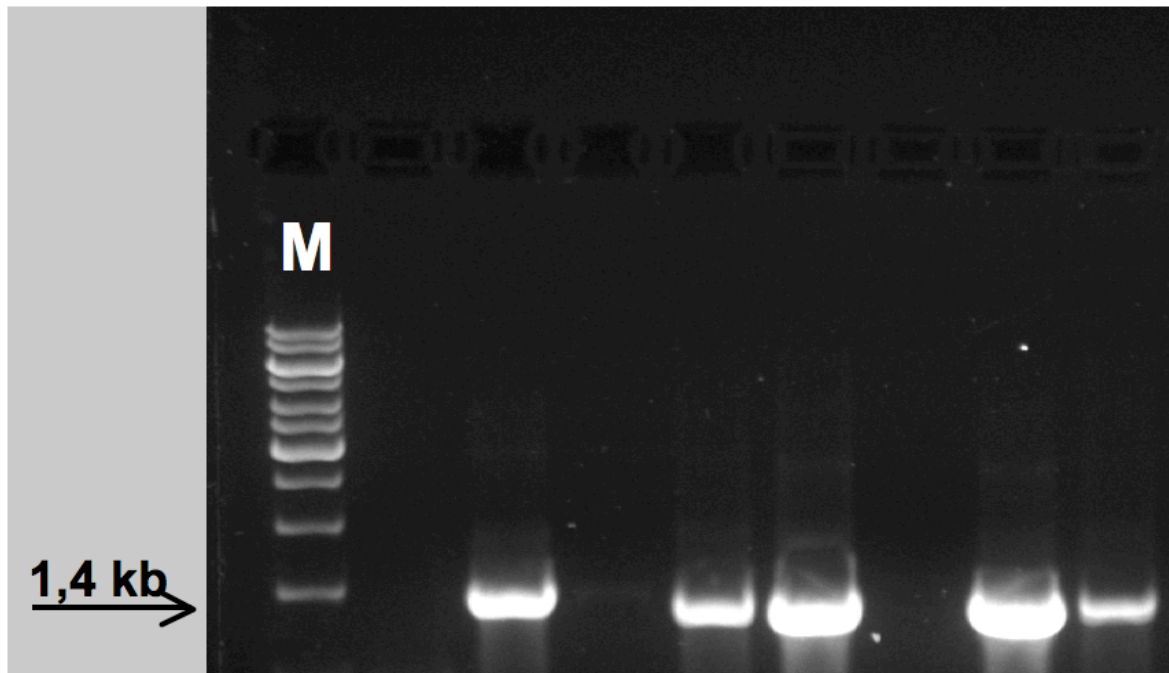


Abbildung 6: 16S rDNA Polymerase-Ketten-Reaktion

Isolat- Nummer	Bezeichnung des Isolats	Ergebnis der Sequenzierung			
		Identität	Bakterienspezies	Accession-Nummer	E-value
6	469/49	>91%	<i>Histophilus somni</i>	AF549400	4.9E-68
15	HSSK M 677/Milch	>98%	<i>Histophilus somni</i>	AB176893	1.1E-144
16	HSSK M 677/HSSB	>94%	<i>Histophilus somni</i>	AB176892	1.4E-97
19	HS SK 8025/Milch	>85%	<i>Histophilus somni</i>	AB176891	7.9E-80
20	HS SK 8025/HSSB	>98%	<i>Histophilus somni</i>	AB176895	3.0E-143
135	<i>H. somnus</i> , WK, 413/76, HO	>99%	<i>Histophilus somni</i>	AF549389	2.2E-188
136	<i>H. somnus</i> , WK, 113/1/81, CO2	>92%	<i>Histophilus somni</i>	AF549396	2.6E-110
137	<i>H. somnus</i> , <i>H. agni</i> , WK, 407/80	>98%	<i>Histophilus somni</i>	AF549390	1.8E-162
138	<i>H. somnus</i> , M 677, CO2	>98%	<i>Histophilus somni</i>	AB176895	5.9E-168
139	<i>H. somnus</i> , WK, 400/74, MO	>88%	<i>Histophilus somni</i>	AF549389	2.9E-95
142	<i>H. somnus</i> , FS, 592/78, HO	>95%	<i>Histophilus somni</i>	AF549393	9.9E-156
143	<i>H. somnus</i> , FS, 326, CO2	>95%	<i>Histophilus somni</i>	JN167604	3.0E-155

Isolat- Nummer	Bezeichnung des Isolats	Ergebnis der Sequenzierung			
		Identität	Bakterienspezies	Accession-Nummer	E-value
149	<i>H. somnus</i> , WK, 355/78, CO2	>98%	<i>Histophilus somni</i>	AB176905	6.2E-174
150	<i>H. somnus</i> , WK, 46/75, CO2	>98%	<i>Histophilus somni</i>	AF549389	2.0E-174
152	<i>H. somnus</i> , FS, 1335/78, CO2	>95%	<i>Histophilus somni</i>	AF549404	2.0E-163
164	<i>H. somnus</i> , FS, 2361/78	>98%	<i>Histophilus somni</i>	AF549390	8.7E-154
172	<i>H. somnus</i> , WK, 487/78, CO2	>98%	<i>Histophilus somni</i>	AB176892	2.3E-132
174	<i>H. somnus</i> , 469/38	>98%	<i>Histophilus somni</i>	AF549393	1.9E-164
175	<i>H. somnus</i> , WK, 275/76, CO2	>90%	<i>Histophilus somni</i>	AB176911	1.9E-164
176	<i>H. somnus</i> , 469/6	>94%	<i>Histophilus somni</i>	AF549399	7.7E-125
177	<i>H. somnus</i> , WK, 278/78, CO2	>81%	<i>Histophilus somni</i>	AF549405	2.0E-32
178	<i>H. somnus</i> , WK, 516/74-2, CO2	>96%	<i>Histophilus somni</i>	AF549404	3.2E-131
179	<i>H. somnus</i> , W, 587, CO2	>81%	<i>Histophilus somni</i>	AF549405	2.0E-32
180	<i>H. somnus</i> , FS, 492/78, CO2	>94%	<i>Histophilus somni</i>	AF549393	8.6E-158

Isolat- Nummer	Bezeichnung des Isolats	Ergebnis der Sequenzierung			
		Identität	Bakterienspezies	Accession-Nummer	E-value
186	<i>H. somnus</i> , W, 271	>92%	<i>Histophilus somni</i>	AB176907	6.6E-133
191	<i>H. somnus</i> , FS, 61/78, CO2	>72%	<i>Histophilus somni</i>	AF549398	1.8E-15
192	<i>H. somnus</i> , WK, 400/74, CO2	>98%	<i>Histophilus somni</i>	AF549389	6.0E-179
194	<i>H. somnus</i> , HS-WK, 279/78	>96%	<i>Histophilus somni</i>	AF549393	1.0E-141

Tabelle 20: 16S rDNA Sequenzanalysen der haemophilen Bakterienisolate

Die *Histophilus somni*-Isolate wurden aufgrund ihrer Identität zu bekannten 16S rDNA Sequenzen in drei Gruppen eingeteilt. Die Einteilung ist in Tabelle 21 dargestellt.

Gruppe	Gruppenkriterium Identität zu <i>Histophilus somni</i>-Isolaten (Datenbank)	Isolate
16S rDNA Gruppe A	>95%	15, 20, 135, 137, 138, 142, 143, 149, 150, 152, 164, 172, 174, 192, 194
16S rDNA Gruppe B	90-95%	6, 16, 136, 175, 176, 180, 186
16S rDNA Gruppe C	80-90%	19, 139, 177, 178, 179, 191

Tabelle 21: 16S rDNA Gruppeneinteilung der haemophilen Bakterienisolate

Basierend auf den erhaltenen 16S rDNA Sequenzen wurden mittels ClustalW Software vergleichende Sequenzanalysen durchgeführt und ein phylogenetischer Stammbaum mit dem Neighbor-Joining-Algorithmus erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools>). Das resultierende Dendrogramm ist in Abbildung 7 dargestellt.

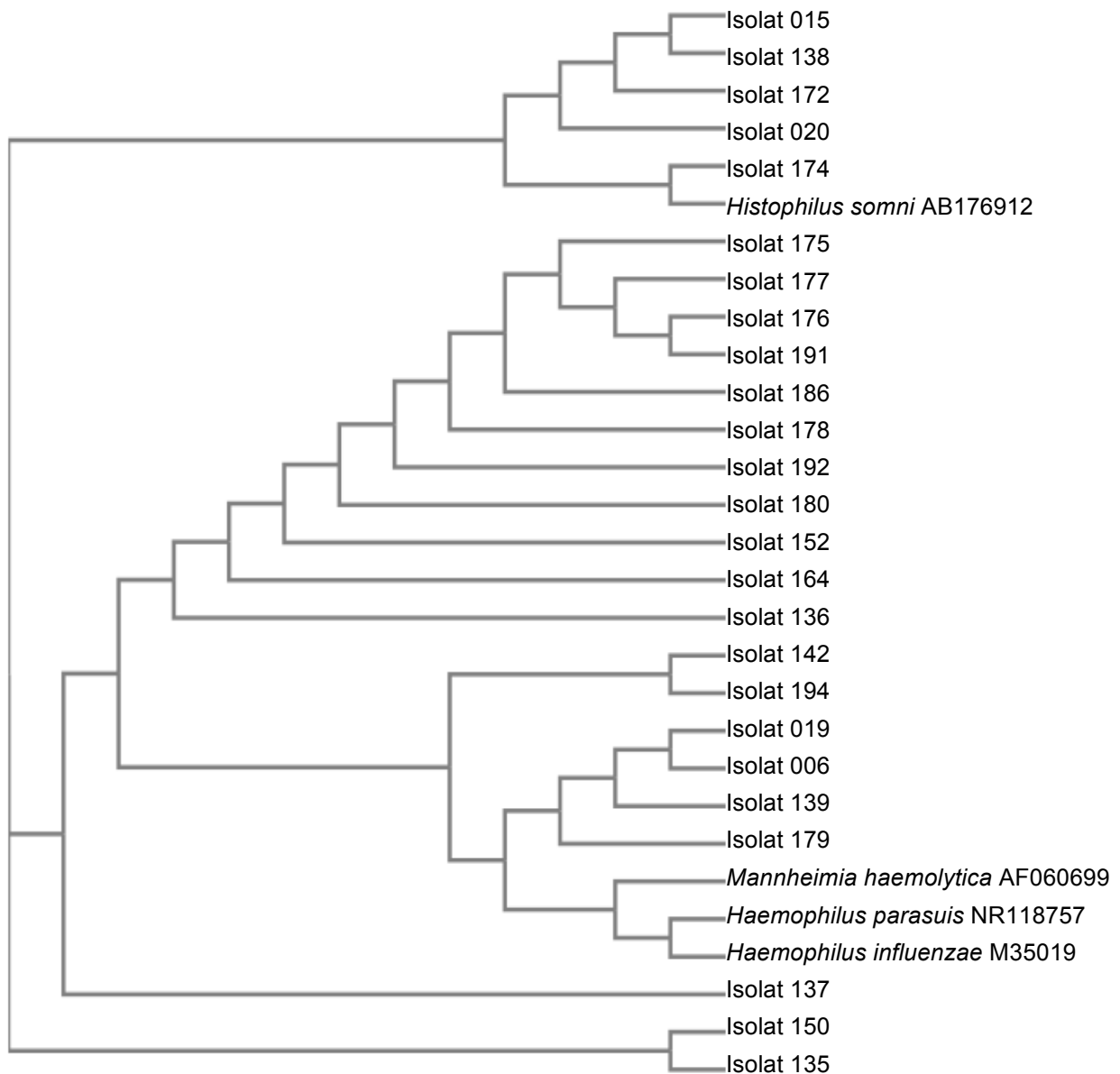


Abbildung 7: Dendrogramm der haemophilen Bakterienisolate (Neighbor-Joining Algorithmus)

4.4 Ribotypisierung der haemophilen Diagnostikisolate

Die erfolgreich kultivierten haemophilen Diagnostik-Isolate (n=13) wurden ribotypisiert. Dazu wurde bakterielle DNA mittels *EcoRI* unterschritten, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylon-Membranen transferiert und mit einer Sonde aus einem ribosomalen *E. coli*-Operon beprobt (hybridisiert). Dadurch konnten die dreizehn Haemophilus/Histophilus-Isolate insgesamt 5 Ribotypen zugeordnet werden. Die Zuordnung ist in Tabelle 22 und Abbildung 8 zusammengefasst.

Ribotyp	Isolate (Diagnostiknummer)
Ribotyp A	19, 136, 186
Ribotyp B	16, 138, 192
Ribotyp C	15, 20, 172
Ribotyp D	177, 178, 179
Ribotyp E	191

Tabelle 22: Zuordnung der Isolate zu den fünf identifizierten Ribotypen

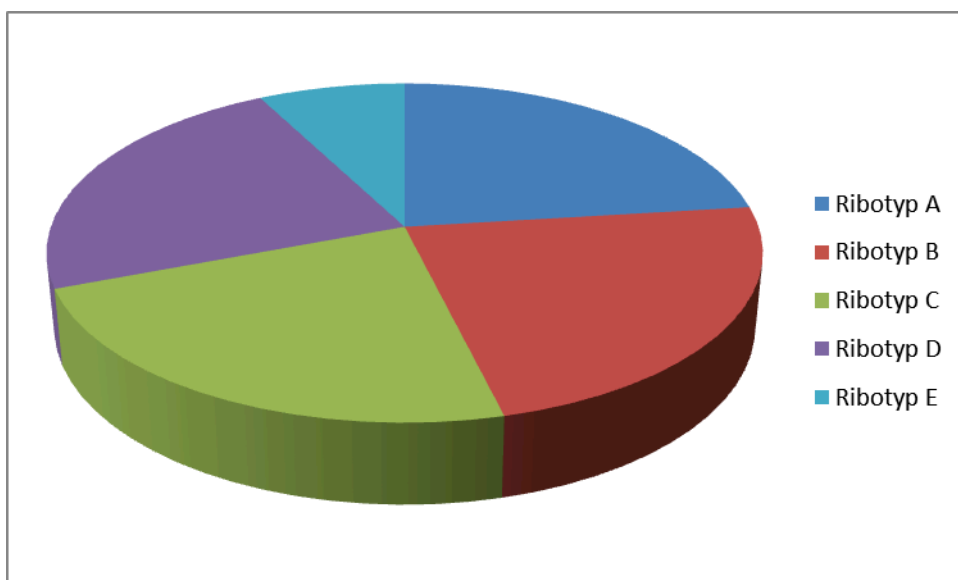


Abbildung 8: Einteilung der *H. somni*-Isolate zu den Ribotypen A-E

4.5 Gegenüberstellung der Typisierungsergebnisse

Die Ergebnisse der Typisierung der 13 *Histophilus somni*-Isolate, die angezüchtet werden konnten sind in Tabelle 23 zusammengestellt.

Isolat	Kulturmorphologie	16S rDNA Gruppe	Ribotyp-Gruppe
15	S	A	Ribotyp C
16	S	B	Ribotyp B
19	S	C	Ribotyp A
20	R	A	Ribotyp C
136	M	B	Ribotyp A
138	R	A	Ribotyp B
172	S	A	Ribotyp C
177	M	C	Ribotyp D
178	M	C	Ribotyp D
179	R	C	Ribotyp D
186	M	B	Ribotyp A
191	M	C	Ribotyp E
192	M	A	Ribotyp B

Tabelle 23: Gegenüberstellung der Typisierungsergebnisse

Die Gegenüberstellung der Typisierungsergebnisse ergab, dass Isolate der 16S rDNA-Gruppe A (n =5) zu den Ribogruppen B (n=2) und C (n=3) gruppiert werden können. Isolate der 16S rDNA-Gruppe B (n=3) wiesen den Ribotypen A (n=1) und B (n=2) auf, die Isolate der 16S rDNA-Gruppe C (n=5) wurden den Ribotypen A (n=1), D (n=3) und E (n=1) zugeordnet.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene haemophile Bakterienisolate aus Wiederkäuern aus der diagnostischen Stammsammlung des Instituts für Veterinärbakteriologie der Universität Zürich retrospektiv kulturell und molekulargenetisch charakterisiert. Haemophile Bakterien der Gattungen *Haemophilus* und *Histophilus* sind weltweit verbreitete Erreger verschiedenster Erkrankungen bei Nutztieren. So finden sich beim Schwein *H. parasuis* als Erreger der Glässer'schen Krankheit mit Polyserositis, Perikarditis, Arthritis, und Meningitis [20] sowie beim Wiederkäuer *Histophilus somni* als Erreger der ISTME/TEME, Endometritis, Mastitis und Myokarditis [146]. Darüber hinaus handelt es sich bei haemophilen Bakterien auch um asymptomatische Schleimhautbesiedler. So besiedelt *Histophilus somni* häufig die Schleimhäute des Respirations- und Genitaltrakts von gesunden Rindern, Schafen und anderen Wiederkäuern [57, 58, 66, 67]. Welche Faktoren dafür verantwortlich sind, ob *Histophilus somni* als primäres Pathogen fungiert oder als Faktoren-assoziiertes fakultatives und opportunistisches Pathogen auftritt, ist nicht geklärt [17]. Man weiss aber, dass *Histophilus somni* häufig in Vergesellschaftung mit anderen Bakterien oder Viren Krankheiten verursacht und dass belastende Faktoren wie Transport, unhygienische Haltungsbedingungen oder immunsupprimierende Umstände bei der Entstehung von *Histophilus somni*-assoziierten Krankheiten eine Rolle spielen [35].

Ziel der Charakterisierung der haemophilen Bakterienisolate war es, mögliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Eigenschaften zu definieren, die eine epidemiologische Eingruppierung ermöglichen würden. Die Tatsache, dass bei weitem nicht jede Infektion zur Ausbildung einer klinischen Symptomatik führt, sondern in der Mehrzahl der Fälle lediglich eine asymptomatische Besiedlung der Schleimhäute resultiert, legt die Hypothese nahe, dass es signifikante Unterschiede zwischen kolonisierenden und pathogenen Bakterien der Gattungen *Histophilus* und *Haemophilus* gibt. Insgesamt stellen sich *Histophilus somni*-Isolate in der Diagnostik in ihren biochemischen, morphologischen und antigenen Eigenschaften als recht heterogen dar. Dadurch ist die kulturelle Diagnose von *Histophilus somni* im Labor nicht immer eindeutig zu stellen [168, 189, 190, 191] und die Differenzierung von einzelnen Stämmen ist problematisch. Dadurch gibt es relativ wenig epidemiologische Daten zu *Histophilus somni*-Infektionen. *Histophilus somni*-Isolate unterscheiden sich in ihrer Kapsel-Morphologie mit ihren M-, S- oder R-Formen [91]. Die in dieser Arbeit charakterisierten *Histophilus somni* zeigten kulturell-morphologisch Unterschiede und konnten den drei verschiedenen Kapsel-Typen (M-Form, S-Form, R-Form) zugeordnet werden. Alle Isolate waren nicht-hämolyisierend, zeigten keine Wachstumsabhängigkeit von X- und V-Faktor und waren Oxidase-positiv und Katalase-

negativ; alle typischen Eigenschaften für *Histophilus somni*. Da kulturelle Methoden aber keine weiteren Möglichkeiten für eine Unterscheidung zwischen einzelnen *Histophilus*-Stämmen bieten, müssen weitere Charakterisierungsmethoden zum Einsatz kommen. *Histophilus somni* besitzt ein „major outer membrane protein“ (MOMP), das eine Differenzierung auf antigener und molekularer Ebene erlaubt [230]. Die Trennschärfe ist dabei nur sehr gering, weshalb weitere molekulare Methoden entwickelt wurden, um verschiedenen *Histophilus somni* Stämme genauer zu charakterisieren, Unterschiede in der Virulenz zu identifizieren und epidemiologische phylogenetische Zusammenhänge zu beschreiben [231]. Die Untersuchung molekulargenetischer Unterschiede zwischen apathogenen und pathogenen Stämmen unter epidemiologischen und phylogenetischen Gesichtspunkten könnte einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Pathogenese von *Histophilus somni*-Infektionen liefern. Dadurch eröffnen sich möglicherweise die Option präventive Massnahmen wie beispielsweise eine gezielte Impfstoffentwicklung selektiv für virulente Stämme zu ergreifen. Hierzu wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene molekulare Verfahren wie Pulsfeld-Gelelektrophorese, Bestimmung von Plasmidprofilen, REA-Typisierung (Restriktionsendonukleasen-Analyse der chromosomalen DNA) und Ribotypisierung (*EcoRI*-basierter Restriktion-Fragment-Längenpolymorphismus der rRNA-Gene) entwickelt und eingesetzt [17]. D'Amours und Mitarbeiter [231] konnten z. B. mit der Methode der Pulsfeld-Gelelektrophorese insgesamt 574 von 582 *Histophilus somni*-Isolate in sieben verschiedene Cluster A-G eingruppiert werden. Fussing und Wegener [232] verglichen Ribotypisierung, REA-Typisierung und Plasmid-Profile miteinander. Dabei konnten insgesamt 12 verschiedene Plasmid-Profile, 33 REA-Typen und 16 verschiedene Ribotypen unterschieden werden. Zudem konnte eine gute Korrelation zwischen Biotyp, REA-Typ und Ribotyp festgestellt werden. Die Plasmid-Typisierung dagegen korreliert nicht mit den anderen Typisierungsmethoden. In der vorliegenden Arbeit wurden im ersten Schritt einer molekularen Charakterisierung die 16S rRNA Gene mittels PCR amplifiziert und anschliessend sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Sequenzen der Datenbank verglichen. Dabei zeigte sich, dass zwar alle erhaltenen 16S rDNA-Sequenzen die höchsten Übereinstimmungen zu Sequenzen von *Histophilus somni* aufwiesen, aber der Grad der Übereinstimmung stark variierte. Interessanterweise zeigten sieben der untersuchten Isolate lediglich eine Übereinstimmung von 90-95%, sechs Isolate sogar nur von 80-90%. Berücksichtigt man die Anwendung der 16S rDNA Identität als Kriterium für die Zugehörigkeit zu einer Spezies und legt einen Mindestwert von 95% als Speziesgrenze zu Grunde, so stellt sich für die rDNA-Gruppen B und C die Frage nach der Bakterienspezies [233]. Zwar gibt es keine universelle Definition für eine Spezies-Zuordnung über die 16S rDNA Sequenzierung und es gibt einerseits verschiedene Bakterienspezies mit identischer 16S rDNA (*Bacillus anthracis* vs. *Bacillus cereus*;

Mycoplasma haemofelis vs. *Mycoplasma haemocanis*), andererseits aber auch Bakterien einer Spezies mit unterschiedlichen 16S rDNAs [234, 235]. Jedoch sprechen Übereinstimmungsraten von <95% mit grosser Wahrscheinlichkeit für unterschiedliche Spezies. Deshalb sollten die *Histophilus* Isolate der 16S rDNA Gruppen B und C eher als *Histophilus* spp. als *Histophilus somni* bezeichnet werden.

Im nächsten Schritt wurden 13 der untersuchten Isolate einer Ribotypisierung unterzogen. Diese Methode beruht auf der Unterschneidung der 16S-23S rDNA mittels Restriktionsenzymen und die Erstellung von molekularen Fingerprints. Die Ribotypisierung weist ein relativ hohes diskriminatorisches Potential auf [232], ist aber auch relativ Material- und zeitaufwändig. Die untersuchten 13 Isolate konnten insgesamt in fünf Ribotypen eingruppiert werden. Die Verteilung auf die drei Ribotypen A-D war gleichmässig, jeder der vier Gruppen konnten jeweils drei Isolate zugeordnet werden, der Gruppe E dagegen nur ein Isolat (Isolat 191). Leider war es aufgrund der verfügbaren Daten und Unterlagen nicht möglich, den untersuchten Bakterienisolaten eine Isolationslokalisation (z.B. Genitaltrakt, Respirationstrakt usw.) zuzuordnen. Die Gegenüberstellung der 16S rDNA-Typisierung und der Ribotypisierung ergab eine gewisse Korrelation. Alle Isolate der 16S rDNA-Gruppe A waren Ribotyp B und C, alle Isolate der 16S rDNA-Gruppe B konnten den Ribotypen A und B zugeordnet werden und die Isolate der 16S rDNA-Gruppe C den Ribotypen A, D und E. Somit konnte ein relativ hoher Grad an Korrelation festgestellt werden. Insgesamt wurden für *Histophilus somni*-Isolate eine recht hohe Heterogenität beschrieben. Fussing und Wegener (1993) [232] charakterisierten 105 Isolate aus dänischen Rindern und erhielten 21 verschiedene Biotypen, 12 Plasmid-Profil-Gruppen, 33 REA-basierte Gruppen, und 16 Ribotyp-Gruppen. In dieser Studie konnte eine Korrelation zwischen REA-Typ und Ribotyp gefunden werden, aber keine Korrelation der beiden vorgenannten Typisierungsergebnisse mit den Plasmid-Typen. Das Ergebnis dieser Studie zeigte aber eindeutig, dass eine molekular-epidemiologische Einschätzung mittels Ribo- und REA-Typisierung möglich sein kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Isolate, die aufgrund der Kultur-basierten Diagnostik als *Histophilus somni* bestimmt wurden eine grosse Heterogenität aufweisen können. Das zeigt sich darin, dass (1) die in den Datenbanken eingestellten 16S rDNA-Sequenzen untereinander divergieren (95-100%), dass (2) alle veröffentlichten Studien mindestens sieben (Pulsfeld-Gelelektrophorese) bis zu 33 (REA-basierte Methode) unterschiedliche Gruppen bei *Histophilus somni*-Isolaten aus Wiederkäuern differenzieren und (3) nicht zuletzt durch die Ergebnisse dieser Arbeit, bei der bei der Analyse der 16S rDNA sehr grosse Unterschiede festgestellt wurden und zudem 13 Isolate in 5 Ribotypen unterteilt werden konnten. Erschwerend kommt bei molekularen epidemiologischen Untersuchungen hinzu, dass Bakterienstämme in Nutztierbeständen dem ständigen

Einfluss von Umwelt- und Wirtsfaktoren wie Immunabwehr oder Selektionsdruck durch Antibiotika-Anwendungen unterworfen sind. Dadurch kann es zum Verlust oder dem Erwerb neuer klonaler Linien kommen, die wiederum mit den vorhandenen molekularen Methoden schwierig einzugruppieren sind.

Nichtsdestotrotz wäre eine internationale Festlegung von einheitlichen Typisierungsmethoden wichtig. Bisherige Untersuchungen und Ergebnisse sprechen dafür, dass *Histophilus somni*-Isolate aus klinisch erkrankten Rindern sich in ihrem pathogenen Potential von Isolaten aus asymptomatischen Trägartieren unterscheiden und diese Unterschiede auch molekular typisierbar sind [236]. Zudem liegen inzwischen Ergebnisse aus Genomsequenzierungen und Vergleichen von apathogenen und pathogenen Isolaten vor, die diese Hypothese stützen. Dabei hat sich gezeigt, dass Pathogenitätsunterschiede offensichtlich durch Deletionen und Insertionen entstanden sind [236]. Weitere vergleichende Untersuchungen werden zum Einen in Zukunft helfen, Kolonisation und Pathogenität zu verstehen und zum Anderen eine Grundlage bilden für die Etablierung einheitlicher Differenzierungsmethoden als Grundlage für epidemiologische Nachforschungen und die Entwicklung von wirksamen Behandlungs- und Bekämpfungskonzepten.

6 Anhang

A.1 Tabelle aller erprobter Lyophilisate

Nummer	Beschriftung Lyophilisat	Datum	Wachstum
1	HPS, SW, 292/2/Bronchus	September 1995	+
2	HPS, SW, 292/2/Bronchus	September 1995	+
3	Wdk, 135/2, CO2	12.03.1981	-
4	Wdk, 135/2, CO2	12.03.1981	-
5	469/52		-
6	469/49		-
7	441/16		-
8	441/32		-
9	PV2, V-Faktorabh. Pasteurella		+
10	<i>Haem. pleuropneumoniae</i> Typ 2	Oktober 1979	+
11	<i>Haem. parasuis</i>	Oktober 1979	+
12	<i>Haem. pleuropneumoniae</i> Typ 1	Oktober 1979	+
13	APP WK 703, Biovar 2	4.11.1988	+
14	APP WK 710, Biovar 1, Serovar 2	4.11.1988	+
15	HSSK M 677/Milch	November 1998	+
16	HSSK M 677/HSSB	November 1998	+
17	HSS-Kontrollstamm, WK 677	Januar 1995	-
18	HSS-Kontrollstamm 8025	Januar 1995	-
19	HSSK 8025/Milch	November 1998	+
20	HSSK 8025/HSSB	November 1998	+
21	WK 179/3/93, <i>Haem. parainfluenzae</i>		+
22	<i>Haem. influenzae</i> , WK 444/78/Amme	Juni 1978	+
23	8025/CO2	30.4.75	+
24	HS 8025 M.	8.12.78	-
25	PV2		+
26	WK 844, <i>H. somnus</i>	12.77	-
27	FS 1786/77/CO2	4.11.80	+
28	<i>H. somnus</i> M. 677	3.12.90	+
29	M. 677/CO2	1.10.80	+
30	WK 685/77 H.S.	31.10.77	-

31	<i>Häm. Somnus</i> M. 677	10.93	+
32	FS 1786/77 H.S.		-
33	WK 598/77	20.8.80	+
34	PVI		+
35	WK 598/77	20.8.80	+
36	<i>H. somnus</i> , WK,469/48/79	18.8.80	-
37	<i>H. somnus</i> , WK,469/50/79	18.8.80	+
38	<i>H. somnus</i> , WK,469/3/79	18.8.80	-
39	<i>H. somnus</i> , WK,469/20/79	18.8.80	-
40	<i>H. somnus</i> , NG,1069/80	06.06.80	-
41	<i>H. somnus</i> , FS,1098/80	03.07.80	+
42	<i>H. somnus</i> , WK,719/76	06.06.80	+
43	<i>H. somnus</i> , WK,684/2/76, CO2	27.11.80	-
44	<i>H. somnus</i> , WK,684/1/76, CO2	04.11.80	+
45	<i>H. somnus</i> , WK,711/5/76, CO2	15.10.76	+
46	<i>H. somnus</i> , WK, 135/3, CO2	12.03.81	-
47	<i>H. somnus</i> , WK,122/4, CO2	12.03.81	+
48	<i>H. somnus</i> , WK,135/1, CO2	12.03.81	+
49	<i>H. somnus</i> , WK,122/2, CO2	12.03.81	+
50	<i>H. somnus</i> , FS, 1765/79, CO2	15.01.81	+
51	<i>H. somnus</i> , 441/27, WK		+
52	<i>H. somnus</i> , WK, 956/79, CO2	17.01.80	-
53	<i>H. somnus</i> , WK, 606/77, CO2	01.10.80	+
54	<i>H. somnus</i> , WK, 562, CO2	03.04.75	+
55	<i>H. somnus</i> , 441/15		+
56	<i>H. somnus</i> , WK, 752/79, CO2	Okt. 79	+
57	<i>H. somnus</i> , WK, 809/79, CO2	08.11.79	+
58	<i>H. somnus</i> , WK, 942/79, CO2	17.01.80	+
59	<i>H. somnus</i> , FS, 1764/79, CO2	15.01.81	-
60	<i>H. somnus</i> , WK, 727/73, CO2	15.10.80	+
61	<i>H. somnus</i> , WK, 679/74	19.08.81	+
62	<i>H. somnus</i> , WK, 749/73, CO2	15.10.80	+
63	<i>H. somnus</i> , WK, 450/2/79	1979	+
64	<i>H. somnus</i> , 441/32	14.08.80	+
65	<i>H. somnus</i> , 441/16	14.08.80	+
66	<i>H. somnus</i> , 441/17	1979	+

67	<i>H. somnus</i> , 450/3	14.08.80	+
68	<i>H. somnus</i> , 450/9	14.08.80	+
69	<i>H. somnus</i> , WK, 441/2, CO2	02.10.80	+
70	<i>H. somnus</i> , WK, 441/6, CO2	02.10.80	+
71	<i>H. somnus</i> , WK, 145/76, CO2	30.03.76	-
72	<i>H. somnus</i> , WK, 144/76, CO2	27.03.79	+
73	<i>H. somnus</i> , 43/76, HO	01.10.80	+
74	<i>H. somnus</i> , Sp 7/76, CO2	16.03.79	+
75	<i>H. somnus</i> , Sp 30/76, CO2	16.03.79	+
76	<i>H. somnus</i> , Sp 2/76	16.03.79	+
77	<i>H. somnus</i> , WK, 558/8, CO2	25.09.80	+
78	<i>H. somnus</i> , WK, 644/80, CO2, Lunge	02.10.80	+
79	<i>H. somnus</i> , WK, 572/80, CO2, Lunge	25.09.80	+
80	<i>H. somnus</i> , WK, 626/1, CO2	25.09.80	+
81	<i>H. somnus</i> , WK, 620/80, CO2, Lunge	25.09.80	+
82	<i>H. somnus</i> , WK, 524/80, CO2	20.08.80	+
83	<i>H. somnus</i> , WK, 633/80, CO2, Lunge	25.09.80	+
84	<i>H. somnus</i> , FS, 1631/80, CO2, Lunge	25.09.80	+
85	<i>H. somnus</i> , WK, 644/80, CO2, Organe	02.10.80	+
86	<i>H. somnus</i> , WK, 135/4, CO2, Lunge	12.03.81	+
87	<i>H. somnus</i> , WK, 135/2, CO2, Lunge	12.03.81	+
88	<i>H. somnus</i> , WK, 122/1, CO2, Lunge	12.03.81	+
89	<i>H. somnus</i> , WK, 113/4, CO2, Lunge	26.02.81	+
90	<i>H. somnus</i> , WK, 113/3, CO2	26.02.81	+
91	<i>H. somnus</i> , WK, 113/1, CO2	26.02.81	+
92	<i>H. somnus</i> , WK, 112/81, CO2	26.02.81	+
93	<i>H. somnus</i> , WK, 724/75, CO2	17.01.78	-
94	<i>H. somnus</i> , WK, 644/75, CO2	21.08.75	+
95	<i>H. somnus</i> , WK, 643/75	06.05.80	+
96	<i>H. somnus</i> , FS, 1541/75, CO2	25.08.75	+
97	<i>H. somnus</i> , WK, 724/75, CO2	15.10.80	+
98	<i>H. somnus</i> , FS, 1269	03.09.81	+
99	<i>H. somnus</i> , WK, 635	02.12.81	+
100	<i>H. somnus</i> , FS, 1120	24.09.81	+
101	<i>H. somnus</i> , WK, 568/3	28.10.81	+
102	<i>H. somnus</i> , WK, 893/1	22.07.81	+

103	<i>H. somnus</i> , Wk, 490/1	24.09.81	+
104	<i>H. somnus</i> , WK, 302	15.07.81	+
105	<i>H. somnus</i> , WK, 617	02.12.81	+
106	<i>H. somnus</i> , WK, 455	03.09.81	+
107	<i>H. somnus</i> , WK 267/2	14.07.81	+
108	<i>H. somnus</i> , WK, 267/4	14.07.81	+
109	<i>H. somnus</i> , FS, 619	14.07.81	+
110	<i>H. somnus</i> , WK, 393/2	22.07.81	+
111	<i>H. somnus</i> , FS, 1260	03.09.81	+
112	<i>H. somnus</i> , WK, 450/28/79	18.08.80	-
113	<i>H. somnus</i> , WK, 450/29/79	18.08.80	-
114	<i>H. somnus</i> , WK, 450/27/79	18.08.80	-
115	<i>H. somnus</i> , WK, 450/19/79	18.08.80	-
116	<i>H. somnus</i> , WK, 450/26/79	18.08.80	-
117	<i>H. somnus</i> , WK, 450/18/79	18.08.80	-
118	<i>H. somnus</i> , WK, 450/20/79	18.08.80	-
119	<i>H. somnus</i> , WK, 450/16/79	18.08.80	-
120	<i>H. somnus</i> , WK, 450/12/79	18.08.80	-
121	<i>H. somnus</i> , WK, 450/31/79	18.08.80	-
122	<i>H. somnus</i> , WK, 450/10/79	18.08.80	-
123	<i>H. somnus</i> , WK, 845/2, CO2	20.12.80	-
124	<i>H. somnus</i> , WK, 850/80, CO2	15.01.81	-
125	<i>H. somnus</i> , FS, 1148/78, CO2	07.78	-
126	<i>H. somnus</i> , FS, 1977/76, CO2	04.11.80	-
127	<i>H. somnus</i> , FS, 607/78, CO2	30.10.80	+
128	<i>H. somnus</i> , WK, 174/79, CO2	15.03.79	-
129	<i>H. somnus</i> , WK, 308/78, CO2	April 78	+
130	<i>H. somnus</i> , WK, 868/76, CO2	13.11.80	+
131	<i>H. somnus</i> , 277/6, CO2	03.04.75	-
132	<i>H. somnus</i> , HS-WK, 115/79, CO2	27.02.79	-
133	<i>H. somnus</i> , Fs, 1877/76, CO2	27.11.80	+
134	<i>H. somnus</i> , WK, 598/75, CO2	07.08.75	-
135	<i>H. somnus</i>, WK, 413/76, HO	Februar 78	-
136	<i>H. somnus</i>, WK, 113/1/81, CO2	26.02.81	+
137	<i>H. somnus</i>, H. Agni, WK, 407/80	20.08.80	-
138	<i>H. somnus</i>, M 677, CO2	01.10.80	+

139	<i>H. somnus</i>, WK, 400/74, MO	Februar 78	-
140	<i>H. somnus</i> , WK, 40/75, CO2	17.02.76	-
141	<i>H. somnus</i> , WK, 25/79, CO 2	25.01.79	-
142	<i>H. somnus</i>, FS, 592/78, HO	30.03.78	-
143	<i>H. somnus</i>, FS, 326, CO2	30.04.75	-
144	<i>H. somnus</i>, FS, 554/79, CO2	27.03.79	-
145	<i>H. somnus</i> , M, 677	03.12.90	-
146	<i>H. somnus</i> , WK, 531/76, CO2	24.04.79	-
147	<i>H. somnus</i> , M, 677	10.93	-
148	<i>H. somnus</i> , 8025, M	08.12.78	-
149	<i>H. somnus</i>, WK, 355/78, CO2	April 76	-
150	<i>H. somnus</i>, WK, 46/75, CO2	15.10.80	-
151	<i>H. somnus</i> , WK, 122/4, CO2	12.03.81	-
152	<i>H. somnus</i>, FS, 1335/78, CO2	04.08.78	-
153	<i>H. somnus</i> , 8025	10.93	-
154	<i>H. somnus</i> , 8025	03.12.90	-
155	<i>H. somnus</i> , WK, 307/79, CO2	24.04.79	+
156	<i>H. somnus</i> , 4109/55		+
157	<i>H. somnus</i> , FS, 1305/78, CO2	30.10.85	+
158	<i>H. somnus</i> , FS, 2198/78	14.12.78	+
159	<i>H. somnus</i> , WK, 512/3/80	20.08.80	+
160	<i>H. somnus</i> , WK, 984/76, CO2	13.11.80	+
161	<i>H. somnus</i> , WK, 313/79, CO2	24.04.79	+
162	<i>H. somnus</i> , WK, 66/75, CO2	15.10.80	-
163	<i>H. somnus</i> , FS, 1094/80	03.07.80	+
164	<i>H. somnus</i>, FS, 2361/78	12.01.79	-
165	<i>H. somnus</i> , WK, 122/2, CO2	12.03.81	+
166	<i>H. somnus</i> , Sp, 94/76, CO2	15.03.79	-
167	<i>H. somnus</i> , WK, 516/76, CO2	24.4.79	+
168	<i>H. somnus</i> , WK, 135/3, CO2	12.03.81	+
169	<i>H. somnus</i> , WK, 832/96, CO2	13.11.80	+
170	<i>H. somnus</i> , WK, 447/78, CO2	Juni 78	+
171	<i>H. somnus</i> , FS, 600/78	12.04.78	-
172	<i>H. somnus</i>, WK, 487/78, CO2	07.78	+
173	<i>H. somnus</i> , 469/39		+
174	<i>H. somnus</i>, 469/38		-

175	<i>H. somnus</i>, WK, 275/76, CO2	14.02.78	-
176	<i>H. somnus</i>, 469/6		-
177	<i>H. somnus</i>, WK, 278/78, CO2	24.04.79	+
178	<i>H. somnus</i>, WK, 516/74-2, CO2	28.10.74	+
179	<i>H. somnus</i>, W, 587, CO2	16.12.74	+
180	<i>H. somnus</i>, FS, 492/78, CO2	12.11.80	-
181	<i>H. somnus</i> , WK, 378/175	12.06.80	+
182	<i>H. somnus</i> , W, 636/74, CO2	16.12.74	+
183	<i>H. somnus</i> , FS, 608/78, CO2	30.10.80	-
184	<i>H. somnus</i> , WK, 454/74, CO2	28.10.74	+
185	<i>H. somnus</i> , W, 629, CO2	16.12.74	+
186	<i>H. somnus</i>, W, 271, CO2	16.12.74	+
187	<i>H. somnus</i> , FS, 828, CO2	14.05.75	+
188	<i>H. somnus</i> , 469/46		-
189	<i>H. somnus</i> , WK, 5/6/74-2, CO2	9.12.74	-
190	<i>H. somnus</i> , B, 646/74	02.75	+
191	<i>H. somnus</i>, FS, 61/78, CO2	17.01.78	+
192	<i>H. somnus</i>, WK, 400/74, CO2	14.02.75	+
193	<i>H. somnus</i> , WK, 425/78, CO2	13.06.78	-
194	<i>H. somnus</i>, HS-WK, 279/78	06.04.78	-

Tabelle 24: Lyophilisate

A.2 Literaturverzeichnis

- [1] Florence Dousse, Andreas Thomann, Isabelle Brodard, Bozena M. Korczak, Yvonne Schlatter, Peter Kuhnert, Raymond Miserez, Joachim Fray: **Routine phenotypic identification of bacterial species of the family *Pasteurellaceae* isolated from animals**, J Vet Diagn Invest 20:716-724 (2008)
- [2] Hans-Joachim Selbitz: **Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie**, Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, 1992
- [3] A. Steinbüchel, F. B. Oppermann-Sanio: **Mikrobiologisches Praktikum, Versuche und Theorie**, Springer-Verlag
- [4] Anton Mayr: **Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre**, Enke Verlag, 8. überarbeitete Auflage, 2007
- [5] Fritz H. Kayser, Kurt A. Bienz, Johannes Eckert, Rolf M. Zinkernagel: **Medizinische Mikrobiologie**, Thieme Verlag, 10. Auflage, 2001
- [6] G. R. Carter, Darla J. Wise: **Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology**, Iowa State Press, Sixth Edition, 2004
- [7] Kristina Haedke: **Untersuchung zu Diagnostik des Polyserositis-Komplexes beim Schwein**, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2008
- [8] Elizabeta Saurer: **NAD⁺-Abhängigkeit bei Pasteurellaceae: Charakterisierung der Nicotinamid-Ribosid-Aufnahme bei *Haemophilus influenzae***, 2006, Würzburg
- [9] Øystein Angen, Peter Ahrens, Peter Kuhnert, Henrik Christensen and Reinier Mitters: **Proposal of *Histophilus somni* gen. Nov., sp. Nov. For the three species *incertae sedis* '*Haemophilus somnus*', '*Haemophilus agni*' and '*Histophilus ovis*'**, Internnaitonal Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology (2003), 53, 1449-1456
- [10] K. Piechulla, R. Mitters, S. Burbach, R. Klussmeier, S. Pohl, and W. Mannheim: **Deoxyribonucleic Acid Relationships of '*Histophilus ovis*, *Haemophilus somnus*', *Haemophilus haemoglobinophilus*, and '*Actinobacillus seminis*'**, Internnaitonal Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology, Jan. 1986, p. 1-7
- [11] Bouchet, B., G. Vanier, M. Jacques, E. Auger, and M. Gottschalk. 1 November 2008, posting date: **Studies on the interactions of *Haemophilus parasuis* with porcine epithelial tracheal cells: limited role of LOS in apoptosis and pro-inflammatory cytokine release**, Microb. Pathog. doi:10.1016/j.mic-path.2008.10.008.
- [12] Pohl, S. 1981: **DNA relatedness among members of *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus***, p. 245-253. In M. Kilian, W. Frederiksen, and E. L. Biberstein (ed.), *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus*, Academic Press, Inc. (London), Ltd., London
- [13] Bouchet, B., G. Vanier, M. Jacques, and M. Gottschalk 2008: **Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells**, Vet. Res. 39:42
- [14] Meika Sack: **Identifizierung neuer virulenzassoziierter Faktoren von *Haemophilus parasuis* und Entwicklung einer Multiplex-PCR**, tierärztliche Hochschule Hannover, 2008
- [15] Monika Köchling: **Untersuchungen zur Verträglichkeit der Anwendung von Porcilis® Glässer bei tragenden Sauen und Saugferkeln sowie zur Methodik der Genotypisierung von *Haemophilus-parasuis*-Stämmen**, Hannover, 2006

- [16] Frank M. Aarestrup, Anne Mette Seyfarth, Øystein Angen: **Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somnus* from pigs and cattle in Denmark**, Veterinary Microbiology 101 (2004) 143-146
- [17] Shivakumara Siddaramppa and Thomas J. Inzana: ***Haemophilus somnus* virulence factors and resistance to host immunity**, Animal Health Research Reviews 5(1); 79-93, 2004
- [18] Mannheim, W. 1981: **Taxonomic implications of DNA relatedness and quinone patterns in *Actinobacillus*, *Haemophilus* and *Pasteurella***, p. 265-280, In M. Kilian, W. Frederiksen, and E. L. Biberstein (ed.), *Haemophilus*, *Pasteurella* and *Actinobacillus*, Academic Press, Inc. (London), Ltd., London
- [19] D. Voet, J.G.Voet, C. W. Pratt: **Lehrbuch der Biochemie**, Wiley-Vch Verlag GmbH u. Co. KGaA, Weinheim, 2002
- [20] K. Nedbalcova, P. Satran, Z. Jaglic, R. Ondriasova, Z. Kucerova: ***Haemophilus parasuis* and Glässer's disease in pigs: a review**, Veterinarni Medicina, 51, 2006 (5): 168-179
- [21] Simone Oliveira, Carlos Pijoan: ***Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control**, Veterinary Microbiology 99 (2004) 1-12
- [22] Hoefling D. C. (1994): **The various forms of *Haemophilus parasuis***, Journal of Swine Health Production, 2, 1
- [23] Cai, X., H. Chen, P. J. Blackhall, Z. Yin, L. Wang, Z. Liu, and M. Jin. 2005: **Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China**, Vet. Microbiol. 111: 231-236
- [24] Werner Zimmermann: ***Haemophilus parasuis*-Infektion – die "Glässersche"- oder Transportkrankheit**, Der praktische Tierarzt 89, Heft 11 [2008]
- [25] James P. Orr: ***Haemophilus somnus* infection: A retrospective analysis of cattle necropsied at the Western College of Veterinary Medicine from 1970 to 1990**, Can Vet J Volume 33, November 1992: 719-722
- [26] Frederick W. Harris, Eugene D. Janzen: **The *Haemophilus somnus* disease complex (Hemophilosis): A review**, Can Vet J Volume 30, October 1989: 816-822
- [27] Claudia Meistermann: **Vergleichende Untersuchung zur Effektivität eines Kombinationsimpfstoffes gegen *Haemophilus parasuis* und *Mycoplasma hyopneumoniae* und eines monovalenten Impfstoffes gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* bei Schweinen**, Hannover, 2006
- [28] Jin, H., Y. Wan, R. Zhou, L. Li, R. Luo, S. Zhang, J. Hu, P. R. Langford, and H. Chen. 2008: **Identification of genes transcribed by *Haemophilus parasuis* in necrotic porcine lung through the selective capture of transcribed sequences (SCOTS)**, Environ. Microbiol. 10:3326-3336
- [29] Peter Kuhnert, Henrik Christensen: ***Pasteurellaceae*, Biology, Genomics and Molecular Aspects**, Horizon Scientific Press, 2008
- [30] A. Olvera, M. Cerdà-Cuellar, G. Mentaberre, E. Casas-Díaz, S. Lavin, I. Marco, V. Aragon: **First isolation of *Haemophilus parasuis* and other NAD-dependent *Pasteurellaceae* of swine from European wild boars**, Veterinary Microbiology 125 (2007) 182-186
- [31] R. L. Walker, E. L. Biberstein, R. F. Prichett, C. Kirkham: **Deoxyribonucleic Acid Relatedness Among "*Haemophilus agni*," "*Haemophilus ovis*," "*Actinobacillus seminis*," and *Haemophilus influenzae***, International Journal of Systematic Bacteriology, Jan. 1985, p. 46-49

- [32] Pina, S., A. Olvera, A. Barcelo, and A. Bensaid. 2008: **Trimeric autotransporters of *Haemophilus parasuis*: generation of an extensive passenger domain repertoire specific for pathogenic strains**, J. Bacteriol. 191:703-708
- [33] Nicolet, J., and E. Scholl. 1981: ***Haemophilus* infections**, p. 368-377, *In* A. D. Leman, R. D. Glock, E. L. Mengeling, R. H. C. Penny, E. Scholl, and B. Straw (ed.) Diseases of swine, 5th ed. University of Iowa State Press, Ames, Iowa
- [34] V. Wayne Lees, William D. G. Yates and Lynette B. Corbeil: **Ovine *Haemophilus somnus*: Experimental Intracisternal Infection and Antigenetic Comparison with Bovine *Haemophilus somnus***, Can J Vet Res 1994; 58:202-210
- [35] Brockmeier S. L. (2004): **Prior infection with *Bordatella bronchieptica* increases nasal colonization by *Haemophilus parasuis* in swine**, Veterinary Microbiology, 99, 75-78
- [36] V. Wayne Lees, Alan H. Meek and Søren Rosendal: **Epidemiology of *Haemophilus somnus* in Young Rams**, Can J Vet Res 1990; 54: 331-336
- [37] K. J. Dewey and P. B. Little: **Environmental Survival of *Haemophilus somnus* and Influence of Secretions and Excretions**, Can J Comp Med 1984; 48: 23-26
- [38] Griner LA, Jensen R. Brown WW: **Infectious embolic meningoencephalitis in cattle**, J Am Vet Med Assoc 1956; 129: 417-421
- [39] Dillmann RC: **Laryngitis in feedlot calves and its association with the *Haemophilus somnus* (Somnifer) complex**, Proc US Anim Health Assoc 1972; 76: 498-501
- [40] Corstvet RE, Panciera RJ, Rinker HB, Starks BL, Howard BS: **Survey of tracheas of feedlot cattle for *Haemophilus somnus* and other selected bacteria**, J Am Vet Med Assoc 1973; 163: 870-873
- [41] Jacek M. Kwiecien, Peter B. Little: ***Haemophilus somnus* and reproductive disease in the cow: A review**, Can Vet J 1991; 32: 595-601
- [42] Widders PR, Paisley LG, Gogolewsky RP, Evermann JF, Smith JW, Corbeil LB: **Experimental abortion and the systemic immun response to '*Haemophilus somnus*' in cattle**, Infect Immun 1986; 54: 555-560
- [43] Robert Higgins, Jean R. Martin, Yves Larouche and Gérard Goyette: **Mastitis caused by *Haemophilus somnus* in a Dairy Cow**, Can Vet J 1987, 28: 117-119
- [44] Hazlett MJ, Little PB, Barnum DA: **Experimental production of mastitis with *Haemophilus somnus* in the lactating bovine mammary gland**, Can Vet J 1983; 24: 135-136
- [45] Armstrong KR, Osborne AD, Janzen ED: ***Haemophilus somnus* mastitis in a dairy cow**, Can Vet J 1986; 27: 211-212
- [46] Roberts DS: **A new pathogen from a ewe with mastitis**, Aust Vet J 1956; 32: 330-332
- [47] Bulgin MS: **Epididymitis in rams and lambs**, Vet Clin North Am Food Anim Pract 1990; 6: 683-690
- [48] Saunders JR, Thiessen WA, Janzen ED: ***Haemophilus somnus* infections. I. A ten year (1969-1978) retrospective study of losses in cattle herds in western Canada**, Can Vet J 1980; 21: 119-123
- [49] Brewer RA, Corbel FA, Stuart FA: **Development of improved methods for the transport and isolation of *Haemophilus somnus***, Res Vet Sci 1985; 39: 299
- [50] Groom SC, **Edmonton restrospective study**. MSc Thesis, University of Guelph, Guelph, Ontario, 1985

- [51] Radostis OM, Janzen ED, Doige C, Jim GK: **Mycoplasma arthritis in feedlot cattle**, Can Vet J 1988; 29: 531
- [52] Beeman KB: **Haemophilus somnus of cattle: an overview**, Compend Contin Educ Pract Vet 1985; 7: S259-S262
- [53] Keister DM: **Haemophilus somnus infections in cattle**, Compend Contin Educ Pract Vet 1981; 53: 987-1004
- [54] Dierks RE, Hanna SA, Dillmann RC: **Epizootiology and pathogenesis of Haemophilus somnus infection**, J Am Vet Med Assoc 1973; 163: 866-869
- [55] Hoerlin AB, Goto K, Young S: **Haemophilus somnus agglutinins in cattle**, J Am Vet Med Assoc 1973; 163: 1375-1377
- [56] Sanfacon D, Higgins R: **Emidemiology of Haemophilus somnus infection in dairy cattle in Quebec**, Can J Comp Med 1983; 47: 456-459
- [57] Corbeil LB, Widders PR, Gogolewsky R, Arthur J, Inzana TJ, Ward ACS: **Haemophilus somnus: bovine reproductive and respiratory disease**, Wash St Univ Agr Res Center, Pullman, Washington, Sci paper 7233, 1986
- [58] Little PB: **Haemophilus somnus complex: pathogenesis of the septicemic thrombotic meningoencephalitis**, Can Vet J 1986; 27: 94-96
- [59] Watts, J.L., Yancey Jr., R.J., Salmon, S.A., Case, C.A., 1994: **A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America**, J. Clin. Microbiol. 32, 725-731
- [60] Vogel, G., Nicolet, J., Martig, J., Tschudi, P., Meylan, M., 2001: **Kälberpneumonien: Aktualisierung des Bakteriellen Erregerspektrum und der Resistenzlage gegenüber Antimikrobiellen Wirkstoffen**, Schweiz. Arch. Tierheilk. 143, 341-350
- [61] Panciera RJ, Dahlgren RR, Rinker HB: **Observations on septicemia of cattle caused by a Haemophilus-like organism**, Pathol Vet 1968; 5: 212-226
- [62] Weide KD, Hibbs CM, Anthony HD: **Diagnosis of bovine encephalitides**, 68th Annu Meet US Livestock Sanit Assoc 1964
- [63] Kennedy PC, Biberstein EL, Howarth JA, Frazier LM, Dungworth DL: **Infectious meningo-encephalitis in cattle, caused by Haemophilus-like organism**, Am J Vet Res 1960; 21: 403-409
- [64] Bailie WE, Anthony HD, Weide KD: **Infectious thrombo-embolic meningoencephalitis (sleeper syndrom) in feedlot cattle**, J Am Vet Med Assoc 1966; 148: 162-166
- [65] Janzen ED: **Myocardial lesions caused by H. somnus in cattle**, Can Vet J 1987; 28: 208
- [66] Humphrey JD, Little PB, Barnum DA, Doig PA, Stephens LR, Thorsen J: **Occurence of Haemophilus somnus in bovine semen and in the prepuce of bulls and steers**, Can J Comp Med 1982; 46: 215-217
- [67] Humphrey JD, Little PB, Barnum DA, Doig PA, Stephens LR, Thorsen J: **Prevalence and distribution of Haemophilus somnus in the male bovine reproductive trakt**, Am J Vet Res 1982; 43: 791-795
- [68] Waldham DG, Hall RF, Meinershagen WA, Card CS, Frank FW: **Haemophilus somnus infection in the cow as a possible contributing factor to weak calf syndrom: Isolation and animal inoculation studies**, Am J Vet Res 1974; 35: 1401-1403
- [69] Cain DV, Dennis SM: **Perinatal calf mortality**, Agri-Pract 1987; 8: 11-16

- [70] Biberstein E.L., White D.C. (1969): **A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species**, Journal of Medical Microbiology, 2, 75-77
- [71] Munch S., Grund S., Kruger M.: **Fimbriae and membranes of *Haemophilus parasuis***, Journal of Veterinary Medicine Series B – Infectious Diseases and Veterinary Public Health, 39, 59-64
- [72] Bakos K., Nilsson A., Thal F. (1952): **Untersuchungen über *Haemophilus suis***, Nordic Veterinary Medicine, 4, 241-255
- [73] Morozumi T., Nicolet J. (1986b): **Some antigenetic properties of *Haemophilus parasuis* and a proposal of serological classification**, Journal of Clinical Microbiology, 23, 1022-1023
- [74] Kielstein P., Rapp-Gabrielson V. J. (1992): **Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* based immunodiffusion using heatstable antigen extract**, Journal of Clinical Microbiology, 30, 862-865
- [75] Kielstein P., Rosner H., Muller W. (1991): **Typing of heat stable soluble *Haemophilus parasuis* antigen by means of agar gel precipitation and the dot blot procedure**, Journal of Veterinary Medicine Series B – Infectious Diseases and Veterinary Public Health, 38, 315-320
- [76] Amano H., Shibata M., Kajio N., Morozumi T. (1994): **Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method**, Journal of Veterinary Medical Science, 56, 639-644
- [77] Biberstein E.L., (1990): **Our understanding of the *Pasteurellaceae***, Canadian Journal of Veterinary Research, 54, 78-82
- [78] Zucker B.A., Baghian A., Traux R., O'Reilly K.L., Storz J. (1996): **Detection of strain-specific antigenic epitopes on the lipooligosaccharide of *Haemophilus parasuis* by use of monoclonal and polyclonal antibodies**, American Journal of Veterinary Research, 57, 63-67
- [79] Miniats O.P., Smart N.L., Rosendal S. (1991b): **Crossprotection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs**, Canadian Journal of Veterinary Research, 55, 37-41
- [80] Solano-Aguilar G.I., Pijoan C., Rapp-Gabrielson V.J., Collins J., Carvalho I.F., Winkelman N. (1999): **Protective role of maternal antibodies against *Haemophilus parasuis* infection**, American Journal of Veterinary Research, 60, 81-87
- [81] Oliveira S., Pijoan C. (2002): **Diagnosis of *Haemophilus parasuis* in affected herds and use of epidemiological data to control disease**, Journal of Swine Health and Production, 10, 221-225
- [82] Nicolet J. (1992): ***Haemophilus parasuis***. In: **Diseases of Swine**. 7th ed. Iowa State University. 526-528
- [83] Segales J., Domingo M., Solano G.I., Pijoan C. (1997): **Immunohistochemical detection of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of experimentally infected swine**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 9, 237-243
- [84] Nielsen R. (1993): **Pathogenicity and immunity studies of *Haemophilus parasuis* serovars**. Acta Veterinaria Scandinavica, 34, 193-198
- [85] Miniats O.P., Smart N.L., Ewert E. (1991a): **Vaccination of gnotobiotic primary specific pathogen-free pigs against *Haemophilus parasuis***. Canadian Journal of Veterinary Research, 55, 33-36

- [86] Takahashi K., Nagai S., Yagihashi T., Ikehata T., Nakano Y., Senna K., Maruyama T., Murofushi J (2001): **A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterin, and evaluation of bivalent vaccine under laboratory and field conditions.** Journal of Veterinary Medical Science, 63, 487-491
- [87] Rapp-Gabrielson V.J. (1999): ***Haemophilus parasuis*.** In: **Diseases of Swine.** 8th ed. Iowa State University, pp. 475-482
- [88] Hans Schadewaldt: **Die Erstbeschreibung des *Haemophilus influenzae* durch Richard Pfeiffer,** in: Dtsch. med. Wschr. 100 (1975), S. 2405-2409
- [89] Wilfried Witte, Dr. med. : **Die Grippe-Pandemie 1918-20 in der medizinischen Debatte,** Inter Science 2006, p 5-20
- [90] Mannheim, W. 1984. Family III. ***Pasteurellaceae*** Pohl 1981, p. 550-552. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore
- [91] Bakos, K. (1955): **Studien über *Haemophilus suis* mit besonderer Berücksichtigung der serologischen Differenzierung,** Vet. Med. Diss, Stockholm
- [92] Miesner AW: **Infectious thromboembolic meningoencephalitis (TEME) in an Iowa feedlot.** Vet Med Small Anim Clin 1978; 73: 1189-1190
- [93] Simsons RR, Maheswaren SK. **Host humoral factors in natural resistance to *Haemophilus somnus*.** Am J Vet Res 1982;43: 1160-1164
- [94] Saunders JR, Janzen ED. ***Haemophilus somnus* infection II. A Canadian field trial of a commercial bacterin: Clinical and serological results.** Can Vet J 1980; 21: 219-224
- [95] Stephens LR, Little PB, Humphrey JD, Wiklie BN, Barnum DA. **Vaccination of cattle against experimentally induced thromboembolic meningoencephalitis with a *Haemophilus somnus* bacterin.** Am Vet Res 1982; 43: 1339-1342
- [96] Groom SC, Little Pb. **Vaccination of cattle against experimentally induced *Haemophilus somnus* pneumonia.** Am J Vet Res 1988; 49: 793-800
- [97] Ribble CR, Jim GK, Janzen ED. **Efficacy of immunization of feedlot calves with a commercial *Haemophilus somnus* bacterin.** Can J Vet Res 1988; 52: 191-198
- [98] Amstutz HE, Horstmann LA, Morter RL. **Clinical evaluation of the efficacy of *Haemophilus somnus* and *Pasteurella* sp. bacterins.** Bovin Pract 1981; 16: 106-108
- [99] Hall RF, Williams JM, Smith GL. **Field evaluation of *Haemophilus somnus* bacterin.** Vet Med Small Anim Clin 1977; 72: 1368-1370
- [100] Williams JM, Smith BS, Murdock FM. **Immunogenicity of a *Haemophilus somnus* bacterin in cattle.** Am J Vet Res 1978; 39: 1756-1762
- [101] Morikoshi T., Kobayashi K., Kamino T., Owaki S., Hayashi S., Hirano S. (1990): **Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan.** Japanese Journal of Veterinary Science, 52, 667-669
- [102] Rafiee M., Blackall P.J. (2000): **Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*.** Australien Veterinary Journal, 78, 846-849
- [103] Rapp-Gabrielson V.J., Gabrielson D.A. (1992): **Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine.** American Journal of Veterinary Research, 53, 951-956

- [104] Tadjine M., Mittal K.R., Bourdon S., Gottschalk M. (2004): **Development of new serological tests for serotyping *Haemophilus parasuis* isolates and determination of their prevalence** in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 839-840
- [105] Blackall P.J., Rapp-Gabrielson V.J., Hampson D.J. (1996): **Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from Australian pigs.** *Australian Veterinary Journal*, 73, 93-95
- [106] Angen Ø., Svensmark B., Mittal K.R. (2004): **Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates.** *Veterinary Microbiology*, 103, 255-258
- [107] Rubies X., Kielstein P., Costs L.I., Riera P., Artigas C., Espuna E. (1999): **Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997.** *Veterinary Microbiology*, 66, 245-248
- [108] D. C. Turk (1984): **The Pathogenicity of *Haemophilus Influenzae*.** *J. Med. Microbiol.*, Vol. 18, 1-16
- [109] Eugen D. Shapiro and Joel I. Ward (1991): **The Emidemiology and Prevention of Disease Caused by *Haemophilus influenzae* Typ b,** *Epidemiologic Reviews*, Vol. 13
- [110] Gholamreza Darai, Michaela Handermann, Hans-Günther Sonntag, Christian A. Tidona und Lothar Zöller **Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen.** Springer Berlin Heidelberg (2009), p. 349-351
- [111] M. Kilian (1975): **A Taxonimic Study of the Genus *Haemophilus*, with a Proposal of a new Species.** *Journal of General Microbiology*, 93, 9-62
- [112] Blackburn, R. H. Boston, R. B. Gilmore, E. St. G., Lovell, R., Wilson, S. P. & Smith, M. M. (1930): **A study of the nasopharyngeal bacterial flora of the Manchester population, during the period July, 1925 to September, 1927.** Rep. publ. Hlth. Med. Subj. Lond., No. 58
- [113] Masters, P. L., Brumfitt, W. Mendez, R. L. & Likar, M. (1958): **Bacterial flora of the upper respiratory tract in Paddington families,** 1952-54. *Brit. med. J. i*, 1200
- [114] Straker, E. A., Hill, A. B. & Lovell, R. (1939): **A studi of the nasopharyngeal bacterial flora of different groups of persons observed in London and South-East England during the years 1930 to 1937.** Rep. publ. Hlth. Med. Subj. Lond., No. 90
- [115] Alexander, H. E., Ellis, C. & Leidy, G. (1942): **Treatment of type-specific *Haemophilus infuenzae* infections in infancy and childhood.** *J. Pediat.* 20, 673
- [116] Pittman, M. (1931): **Variation and type-specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*.** *J. exp. Med.* 53, 471
- [117] Thilenius, O. G. & Carter, R. E. (1959): **Cellulitis of the leg due to type b *Haemophilus influenzae*.** *J. Pediat.* 54 372
- [118] Turk, D. C. (1982): ***Haemophilus influenzae*,** PHLS Monograph no. 17
- [119] Sell S H, Turner D J, Federspiel C F 1973 **Natural infection with *Haemophilus influenzae* in children: 1. Types identified.** In: Sell S H W, Karzon D T (eds) ***Haemophilus influenzae*.** Vanderbilt University Press, Nashville, Tennessee. pp 3-12.
- [120] Fothergill L D, Wright J 1933 **Influenzal meningitis. The relation of age incidence to the bactericidal power of blood against the causal organism.** *Journal of Immunology* 24:273-284.

- [121] Wood P R, McKee K T, Lohr J A, Hendley J O 1982 ***Haemophilus influenzae* meningitis in school-aged children.** Journal of the American Medical Association 247:1162-1163.
- [122] Spagnulo P J, Ellner J J, Lerner P I, McHenry M C, Flatauer F, Rosenberg P, Rosenthal M S 1982 ***Haemophilus influenzae* meningitis: the spectrum of disease in adults.** Medicine (Baltimore) 61:74-85.
- [123] Holdaway M D, Turk D C 1967 **Capsulated *Haemophilus influenzae* and respiratory-tract disease.** Lancet 1:358-360.
- [124] Blackburn R H, Boston R B, Gilmore E StG, Lovell R, Wilson S P, Smith M M 1930 **Report of a study of the nasopharyngeal bacterial flora of a group of the Manchester population, during the period July, 1925 to September 1927.** Reports on Public Health and Medical Subjects, Ministry of Health, London, No. 58
- [125] Pittman M 1931 **Variation and specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*.** Journal of Experimental Medicine 53:471-492
- [126] Wood W B 1960 **Phagocytosis, with particular reference to encapsulated bacteria.** Bacteriological Reviews 24:41-49
- [127] Sutton A, Schneerson R, Robbins J B 1982 **Resistance to complement determines virulence of *Haemophilus influenzae* type b.** In: Sell S H, Wright P F (eds) ***Haemophilus influenzae: epidemiology, immunology and prevention of disease.*** Elsevier Biomedical, New York. pp 219-225
- [128] Male C J 1979 **Immunoglobulin A1 protease production by *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*.** Infection and Immunity 26:254-261.
- [129] Kilian M, Mestecky J, Schrohenloher R E 1979 **Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease.** Infection and Immunity 26:143-149.
- [130] Mulks M H, Kornfeld S J, Plaut A G 1980 **Specific proteolysis of human IgA by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*.** Journal of Infectious Diseases 141:450-456.
- [131] Flesher A R, Insel R A 1978 **Characterization of lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*.** Journal of Infectious Diseases 138:719-730.
- [132] Tuyau J E, Sims W 1983 **Aspects of the pathogenicity of some oral and other haemophili.** Journal of Medical Microbiology 16:467-475.
- [133] Reinert RR, Rodloff AC, Halle E et al. **Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Germany and activity of the Ketolide Telithromycin: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000).** Chemotherapy 2004; 50: 143-151 (4)
- [134] Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Gruneberg RN. **The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents.** J Antimicrob Chemother 2003; 52: 229-246 (4)
- [135] Johnson AP, Sheppard CL, Harnett SJ et al. **Emergence of a fluoroquinolone-resistant strain of *Streptococcus pneumoniae* in England.** J Antimicrob Chemother 2003; 52: 953-960 (4)
- [136] Blosser-Middleton R, Sahm DF, Thornsberry C et al. **Antimicrobial susceptibility of 840 clinical isolates of *Haemophilus influenzae* collected in four European countries in 2000-2001.** Clin Microbiol Infect 2003; 9: 431-436 (4)
- [137] Ward J. **Prevention of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease: lessons from vaccine efficacy trials.** Vaccine 1991; 9, Suppl: S 17-24.

- [138] Bundesamt für Gesundheit, Fachgruppe für Impffragen. **Empfehlungen zur Prävention von *Haemophilus influenzae* Typ b-Infektionen bei Kindern.** Richtlinien und Empfehlungen (ehemals Supplementum VII). Bern: Bundesamt für Gesundheit, 1991.
- [139] Eskola J, Kähyty H, Takala AK, Peltola H, Rönnerberg P, Kela E, Pekkanen E, McVerry P, Mäkelä H. **A randomized, prospective field trial of a conjugate vaccine in the protection of infants and young children against invasive *Haemophilus influenzae* type b disease.** N Engl J Med 1990; 323: 1381-7.
- [140] Santosham M, Wofff M, Reid R, Hohenboken M, Bateman M, Goepp J, Corese M, Sack D, et al. **The efficacy in Navajo infants of a conjugate vaccine consisting of *Haemophilus influenzae* type b-polysaccharide and Neisseria meningitidis outer-membrane protein complex.** N Engl J Med 1991; 324: 1767-72.
- [141] Black SB, Shinefield HR, Fireman B, Hiatt R, Polen M, Vittinghoff E, and the Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Pediatrics Group. **Efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate *Haemophilus influenzae* type b (hbOC) vaccine.** Pediatr Infect Dis J 1991; 10:97-104.
- [142] Stanislav Targowski1t - and Hanna Targowski. **Characterization of a *Haemophilus paracuniculus* Isolated from Gastrointestinal Tracts of Rabbits with Muroid Enteritis.** Journal of Clinical Microbiology, Jan. 1979, p. 33-37
- [143] M. Beauregard Aand R. Higgins. Case Report. **Ovine Mastitis Due to *Histophilus ovis*.** Département de Pathologie et Microbiologie, Faculte' de Medecine veterinaire,Universite de Montre'al, C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Quebec J2S 7C6. Can Vet J 1983; 24: 284-286.
- [144] Claxton, P.D. and R.E. Everett. **Recovery of an organism resembling *Histophilus ovis* from a ram.** Aust. vet. J. 42: 457-458. 1966.
- [145] Kater, J.C., S.C. Marshall and W.C. Hartley. **A specific suppurative synovitis and pyaemia in lambs.** N.Z. vet. J. 10: 143-144. 1962.
- [146] Stephens, L. R., P. B. Little, B. N. Wilkie, and D. A. Barnum. 1981. **Infectious thromboembolic meningoencephalitis in cattle: a review.** J. Am. Vet. Med. Assoc. 178:378-384.
- [147] P. J. Blackall, L. E. Eaves and G. Aus. **Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page Scheme: Comparison of the Use of Agglutination and Hemagglutination-Inhibition Tests.** Avian Diseases Vol. 34, No. 3 (Jul. - Sep., 1990), pp. 643-645
- [148] Edgardo Soriano Vargas and Horacio Raul Terzolo. ***Haemophilus paragallinarum*: Etiology of infectious coryza.** Vet. Méx. 35 (3) 2004
- [149] Horner R. F., Bishop G. C., Jarvis C. J., Coetzer T. H. T. (1995) **NAD (V-factor)-independent and typical *Haemophilus paragallinarum* infection in commercial chickens: a five year field study.** Avian Pathol. 24:453-463.
- [150] M. Menuo and E. L. Biberstein. **Growth requirements of *Haemophilus somnus*,** Journal of Clinical Microbiology. Nov. 1982, vol. 16 no. 5 798-802
- [151] P. J. Blackall. **Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic Options.** Clin. Microbiol. Rev. October 1999 vol. 12 no. 4 627-632
- [152] Flat, R. E., S. H. Weisbroth, and A. L. Kraus. 1974. **Metabolic, traumatic, mycotic and miscellaneous disaese of rabbits,** p. 437-440. In S. H. Weisbroth, R. E. Flat, and A. L. Kraus (ed.), **The biology of the laboratory rabbit.** Academic Press Inc., New York.

- [153] Joyce Frazer and K. B. Rogers. **The isolation of an X-dependent strain of *Haemophilus* from otitis media identified as *H. haemoglobinophilus* (*canis*)**. J. clin. Path., 1972, 25, 179-180
- [154] Hirschmann JV, Everett ED, **Haemophilus influenzae infections in adults: report of nine cases and a review of the literature**. Medicine [1979, 58(1):80-94]
- [155] Bisgaard M: 1993, **Ecology and significance of *Pasteurellaceae* in animals**. Int J Med Microbiol 279:7-26.
- [156] P. H. A. Sneath and R. Johnson, **Numerical Taxonomy of *Haemophilus* and Related Bacteria**, International Journal of Systematic Bacteriology, October 1973, p. 405-418
- [157] Kilian M., Biberstein E. L. (1984). ***Haemophilus*** Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 561. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, pp. 558-569. Edited by N. R. Krieg and J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins
- [158] Mutters, R., Piechulla, K., Hinz, K. H. and Mannheim, W. (1985). ***Pasteurella avium*** (Hinz and Kunjara 1977) comb. nov. and ***Pasteurella volantium*** sp. nov. Int J Syst Bacteriol 35, 5-9.
- [159] Pohl, S., Bertchinger, W., Frederiksen, W. and Mannheim, W. (1983). **Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness**. J Syst Bacteriol 33, 510-514.
- [160] Garcia-Delgado GA, Little PB, Barnum DA. **A comparison of various *Haemophilus somnus* strains**. Can J Comp Med 1977; 41: 380-388.
- [161] Blood DC, Radostits OM, Henderson JA. **Veterinary Medicine**. 6th ed. London: Baillière Tindall, 1983: 703.
- [162] Sugimoto C, Mitani K, Nakazawa M, Sekizaki T, Terakado N, Isayama Y. **In vitro susceptibility of *Haemophilus somnus* to 33 antimicrobial agents**. Antimicrob Agents Chemother 1983; 23: 163-165.
- [163] Lewis, P.A., Shope, R.E., 1931. **Swine influenza. II. Haemophilic bacillus from the respiratory tract of infected swine**. J. Exp. Med. 54, 361-371.
- [164] Little, T.W.A., 1970. ***Haemophilus* infection in pigs**. Vet. Rec. 87, 399-402.
- [165] A. J. Weinstein, **Atemwegsinfektionen durch *Haemophilus influenzae* bei Erwachsenen**, Infection 15 (1987) Suppl. 3
- [166] Pohl. S. (1979). **Reklassifizierung der Gattung *Actinobacillus* Brumpt 1910, *Haemophilus* Winslow et al. 1971 und *Pasteurella* Trevisan 1887 anhand phänotypischer und molekularer Daten, insbesondere der DNS-Verwandtschaften bei DNS:DNS-Hybridisierung *in vitro* und Vorschlag einer neuen Familie, *Pasteurellaceae***. Inaugural dissertation, Philipps-Universität Marburg/Lahn.
- [167] Kilian M (2003). **Genus *Haemophilus*** Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 561. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 2 (in press)**. Edited by G. M. Garrity. New York: Springer.
- [168] Stephens, L. R., Humphrey, J. D., Little, P. B. & Barnum, D. A.(1983). **Morphological, biochemical, antigenic, and cytochemical relationships among *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Histophilus ovis*, and *Actinobacillus seminis***. J Clin Microbiol 17, 728–737.

- [169] de Ley, J., Mannheim, W., Muters, R. & 7 other authors (1990). **Inter- and intrafamilial similarities of rRNA cistrons of the *Pasteurellaceae***. Int J Syst Bacteriol 40, 126–137.
- [170] Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Olsen, I. & Fraser, G. J. (1993). **Phylogeny of the *Pasteurellaceae* as determined by comparison of 16S ribosomal ribonucleic acid sequences**. Zentbl Bakteriol 279, 35–44.
- [171] Bisgaard, M. (1995). **Taxonomy of the family *Pasteurellaceae***, Pohl 1981. In *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*, pp. 1–7. Proceedings from the Third International Conference on *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*, 31 July–4 August 1993, Edinburgh, Scotland, UK. Edited by W. Donachie, F. A. Lainson & J. C. Hodgson. London: Plenum Press.
- [172] Roche, R. J., and E. R. Moxon. 1995. **Phenotypic variation in *Haemophilus influenzae*: the interrelationship of colony opacity, capsule and lipopolysaccharide**. Microb. Pathog. 18:129–140
- [173] Gu XX, Tsai CM, Ueyama T, Barenkamp SJ, Robbins JB, et al. (1996) **Synthesis, characterization, and immunologic properties of detoxified lipooligosaccharide from nontypeable *Haemophilus influenzae* conjugated to proteins**. Infect Immun 64: 4047–4053.
- [174] Barenkamp, S. J., and E. Leininger. 1992. **Cloning, expression and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis***. Infect. Immun. 60:1302-1313.
- [175] St Geme, J.W., III, and Grass, S. (1998) **Secretion of the *Haemophilus influenzae* HMW1 and HMW2 adhesins involves a periplasmic intermediate and requires the HMWB and HMWC proteins**. Mol Microbiol 27: 617–630.
- [176] St Geme, J.W., III, Falkow, S., and Barenkamp, S.J. (1993) **High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells**. Proc Natl Acad Sci USA 90: 2875–2879.
- [177] Henderson, I.R., and Nataro, J.P. (2001) **Virulence functions of autotransporter proteins**. Infect Immun 69: 1231–1243.
- [178] Hultgren, S.J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St Geme, J.W., III, and Normark, S. (1993) **Pilus and nonpilus bacterial adhesins. assembly and function in cell recognition**. Cell 73: 887–901.
- [179] Reddy, M.S., Bernstein, J.M., Murphy, T.F., and Faden, H. (1996) **Binding between outer membrane proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* and human nasopharyngeal mucin**. Infect Immun 64: 1477–1479.
- [180] van Ham, S. M., L. van Alphen, F. R. Mooi, and J. P. M. van Putten. 1994. **The fimbrial gene cluster of *Haemophilus influenzae* type b**. Mol. Microbiol. 13:673–684.
- [181] Metcalf DS, MacInnes JI. 2007. **Differential expression of *Haemophilus parasuis* genes in response to iron restriction and cerebrospinal fluid**. Can. J. Vet. Res. 71:181-188.
- [182] Rioux, S., C. Galarneau, J. Harel, M. Kobisch, J. Frey, M. Gottschalk, u. M Jacques (2000): **Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1**. Microb. Pathog. 28, 279-289
- [183] Hallström, T., et al. (2009) **Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance**. J. Immunol. 183, 2593-2601
- [184] St Geme, J.W., III, Kumar, V.V., Cutter, D., and Barenkamp, S.J. (1998) **Prevalence and distribution of the HMW and Hia genes and the HMW and Hia adhesins**

- among genetically diverse strains of nontypeable *Haemophilus influenzae*. Infect Immun 66: 364–368
- [185] Mulks MH, Kornfeld SJ, Frangione B, Plaut AG: **Relationship between the specificity of IgA proteases and serotypes in *Haemophilus influenzae***. J Infect Dis 1982, 146:266-274.
- [186] Trends Microbiol. 2010 Jun; 18 (6): 258-65. ***Haemophilus influenzae* and the complement system**. Hallström T, Riesbeck K. Source Medical Microbiology, Department of Laboratory Medicine Malmö, Lund University, Skåne University Hospital, SE-205 02 Malmö, Sweden
- [187] Kennedy, P.C., L.M. Frazier, G.H. Theilen and E.L. Biberstein. 1958. **A septicemic disease of lambs caused by *Haemophilus agni* (new species)**. Am. J. Vet. Res. 19: 645-654.
- [188] Rahaley, R. S. & White, W. E. (1977). ***Histophilus ovis* infection in sheep in Western Victoria**. Aust Vet J 53, 124–127.
- [189] Canto GJ, Biberstein EL. **Serological diversity in *Haemophilus somnus***. J Clin Microbiol. 1982 Jun;15(6):1009–1015.
- [190] Stephens LR, Aukema R, Murray LJ (1987). **Antigenic heterogeneity of *Haemophilus somnus***. Australian Veterinary Journal 64: 113.
- [191] Howard M.D., Cox A.D., Weiser J.N., Schurig G.G., Inzana T.J. 2000. **Antigenic diversity of *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide: phase-variable accessibility of the phosphorylcholine epitope**. J Clin Microbiol 38: 4342-4349.
- [192] Glässer K. (1910): **Die fibrinöse Serosen- und Gelenkentzündung der Ferkel**. In: **Die Krankheiten des Schweines**. M. & H. Schaper, Hannover. 122–125.
- [193] Castilla KS, de Gobbi DD, Moreno LZ, et al. **Characterization of *H. parasuis* isolated from Brazilian swine through serotyping, AFLP and PFGE**. Res Vet Sci 2012 Jun; 92(3) :366-71.
- [194] Mullins, Michael A · Register, Karen B · Brunelle, Brian W · Aragon, Virginia · Galofré-Mila, Nuria · Bayles, Darrell O · Jolley, Keith A. **A curated public database for multilocus sequence typing (MLST) and analysis of *Haemophilus parasuis* based on an optimized typing scheme**. Veterinary microbiology, 2012
- [195] Lopez, R., S. Mendoza, E. Esquivel, A. Romero et al. (2004): **Production of an immunofluorescent conjugate for the diagnosis of Glässer's disease using *Haemophilus parasuis* as an antigen**. in: 18th Congr. Int. Pig Vet. Soc., Hamburg 2004, Proc. 1, 210
- [196] Lichtensteiger, C. A., u. E. R. Vimr (2002): **Purification and renaturation of membrane neuraminidase from *Haemophilus parasuis***. Vet. Microbiol. 93, 79-87
- [197] Charland, N., C. G. D'Silva, R. A. Dumont u. D. F. Niven (1995): **Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis***. Can. J. Microbiol. 41, 70-74
- [198] Chandler, C. A., L. D. Fothergill u. J. H. Dingle (1939): **The Pattern of Dissociation in *Hemophilus influenzae***. J. Bacteriol. 37, 415-427
- [199] Rosner, H., P. Kielstein, W. Muller u. B. Rohrmann (1991): **Relationship between serotype, virulence and SDS-PAGE protein patterns of *Haemophilus parasuis***. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 98, 327-330
- [200] Moller, K., u. M. Kilian (1990): **V factor-dependent members of the family *Pasteurellaceae* in the porcine upper respiratory tract**. J. Clin. Microbiol. 28, 2711-2716

- [201] Oliveira, S., L. Galina u. C. Pijoan (2001): **Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections.** J. Vet. Diagn. Invest 13, 495-501
- [202] Jung, K., Ha, Y., Kim, S.H. & Chae, C., 2004, **Development of polymerase chain reaction and comparison with in situ hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues,** Journal of Veterinary Medical Science 66, 841-845.
- [203] Angen, O., Oliveira, S., Ahrens, P., Svensmark, B. & Leser, T.D., 2007, **Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*,** Veterinary Microbiology 119, 266-276.
- [204] Calsamiglia, M., C. Pijoan, G. Solano u. V. Rapp-Gabrielson (1999): **Development of an oligonucleotide-specific capture plate hybridization assay for detection of *Haemophilus parasuis*.** J. Vet. Diagn. Invest. 11, 140-145
- [205] Wissing, A., J. Nicolet, P. Boerlin (2001): **The current antimicrobial resistance situation in Swiss veterinary medicine.** Schweizer Archiv für Tierheilkunde 143, 503 - 510
- [206] Ritzmann, M., K. Heinritzi (2005): **Klinisches Bild, Diagnostik und Differentialdiagnostik der Glässerschen Krankheit.** Tierärztliche Praxis 33, 61 – 64
- [207] Müller, C., M. Doherr, C. Egli, D. Sicher, B. Mourits, W. Zimmermann (2004): ***Haemophilus parasuis* infection: vaccination and serological follow-up.** Proc. 18th Int. Pig Vet. Soc. Congress, Hamburg, Deutschland, Vol. 1, 187
- [208] Rapp-Gabrielson, V.J., S. Oliveira, C. Pijoan (2006): ***Haemophilus parasuis* In: Straw, B., J. Zimmerman, S. D'Allaire, D.J. Taylor (Hrsg.): Diseases of swine.** 9th edition, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 681-690
- [209] Bak, H., u. H. J. Riising (2002): **Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*.** Vet. Rec. 151, 502-505
- [210] Kirkwood, R.N., S.A. Rawluk, A.C. Cegielski, A.J. Otto (2001): **Effect of pig age and autogenous sow vaccination on nasal mucosal colonization of pigs by *Haemophilus parasuis*.** J. Swine Health Prod. 9:77-79
- [211] Rapp-Gabrielson, V.J., G.J. Kocus, J.T. Clark, K.M. Stephen (1997): ***Haemophilus parasuis*: immunity in swine after vaccination.** Vet. Med. 92:83-90
- [212] Corbeil, L. B., F. D. Bastida-Corcuera, and T. J. Beveridge. 1997. ***Haemophilus somnus* immunoglobulin binding proteins and surface fibrils.** Infect Immun 65:4250-4257.
- [213] Widders, P. R., L. A. Dorrance, M. Yarnall, and L. B. Corbeil. 1989. **Immunoglobulin-binding activity among pathogenic and carrier isolates of *Haemophilus somnus*.** Infect Immun 57:639-642.
- [214] Widders, P. R., J. W. Smith, M. Yarnall, T. C. McGuire, and L. B. Corbeil. 1988. **Non-immune immunoglobulin binding by "*Haemophilus somnus*".** J Med Microbiol 26:307-311.
- [215] Yarnall, M., R. P. Gogolewski, and L. B. Corbeil. 1988. **Characterization of two *Haemophilus somnus* Fc receptors.** J Gen Microbiol 134:1993-1999.
- [216] Yarnall, M., P. R. Widders, and L. B. Corbeil. 1988. **Isolation and characterization of Fc receptors from *Haemophilus somnus*.** Scand J Immunol 28:129-137.
- [217] Corbeil, L. B., R. P. Gogolewski, L. R. Stephens, and T. J. Inzana. 1995. ***Haemophilus somnus*: Antigen Analysis and Immune Responses,** p. 63-73. In

- W. Donachie, F. A. Lainson, and J. C. Hodgson (ed.), *Haemophilus, Actinobacillus, and Pasteurella*. Plenum Press, New York; London.
- [218] Gomis, S. M., D. L. Godson, T. Beskorwayne, G. A. Wobeser, and A. A. Potter. 1997. **Modulation of phagocytic function of bovine mononuclear phagocytes by *Haemophilus somnus***. *Microb Pathog* 22:13-21.
- [219] Hubbard, R. D., M. L. Kaeberle, J. A. Roth, and Y. W. Chiang. 1986. ***Haemophilus somnus*-induced interference with bovine neutrophil functions**. *Vet Microbiol* 12:77-85.
- [220] Lederer, J. A., J. F. Brown, and C. J. Czuprynski. 1987. **"*Haemophilus somnus*," a facultative intracellular pathogen of bovine mononuclear phagocytes**. *Infect Immun* 55:381-387.
- [221] Inzana, T. J., R. P. Gogolewski, and L. B. Corbeil. 1992. **Phenotypic phase variation in *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide during bovine pneumonia and after in vitro passage**. *Infect Immun* 60:2943-2951.
- [222] Mandrell, R. E., J. M. Griffiss, and B. A. Macher. 1988. **Lipooligosaccharides (LOS) of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* have components that are immunochemically similar to precursors of human blood group antigens. Carbohydrate sequence specificity of the mouse monoclonal antibodies that recognize crossreacting antigens on LOS and human erythrocytes** [published erratum appears in *J Exp Med* 1988 Oct 1;168(4):1517]. *J Exp Med* 168:107-126.
- [223] Mandrell, R. E., R. McLaughlin, Y. Aba Kwaik, A. Lesse, R. Yamasaki, B. Gibson, S. M. Spinola, and M. A. Apicella. 1992. **Lipooligosaccharides (LOS) of some *Haemophilus* species mimic human glycosphingolipids, and some LOS are sialylated**. *Infect Immun* 60:1322-1328.
- [224] Schneider, H., J. M. Griffiss, J. W. Boslego, P. J. Hitchcock, K. M. Zahos, and M. A. Apicella. 1991. **Expression of paragloboside-like lipooligosaccharides may be a necessary component of gonococcal pathogenesis in men**. *J Exp Med* 174:1601-1605.
- [225] Thompson KG and Little PB (1981). **Effect of *Haemophilus somnus* on bovine endothelial cells in organ culture**. *American Journal of Veterinary Research* 42:748-754
- [226] Ward AC, Weiser GC, Anderson BC, Cummings PJ, Arnold KF, Corbeil LB. ***Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) in bighorn sheep**. *Can J Vet Res*. 2006 Jan;70(1):34-42.
- [227] Dijkman R, Wellenberg GJ, van der Heijden HM, Peerboom R, Olvera A, Rothkamp A, Peperkamp K, van Esch EJ. **Analyses of Dutch *Haemophilus parasuis* isolates by serotyping, genotyping by ERIC-PCR and Hsp60 sequences and the presence of the virulence associated trimeric autotransporters marker**. *Res Vet Sci*. 2012 Oct;93(2):589-95. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.10.013. Epub 2011 Nov 25. PubMed PMID: 22119186.
- [228] Challacombe JF, Duncan AJ, Brettin TS, Bruce D, Chertkov O, Detter JC, Han CS, Misra M, Richardson P, Tapia R, Thayer N, Xie G, Inzana TJ. **Complete genome sequence of *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) strain 129Pt and comparison to *Haemophilus ducreyi* 35000HP and *Haemophilus influenzae* Rd**. *J Bacteriol*. 2007 Mar;189(5):1890-8.
- [229] Brosius, J., A. Ullrich, M.A. Raker, A. Gray, T.J. Dull, R.R. Gutell, H.F. Noller 1981. **Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RLNA operon of *E. coli***. *Plasmid* 6:112-118

- [230] Khan MS, Tanaka A, Ide H, Hoshinoo K, Hanafusa Y, Tagawa Y. **Molecular characterization of the major outer membrane protein of *Haemophilus somnus*.** Vet Microbiol. 2005 May 20;107(3-4):179-92
- [231] D'Amours GH, Ward TI, Mulvey MR, Read RR, Morck DW. **Genetic diversity and tetracycline resistance genes of *Histophilus somni*.** Vet Microbiol. 2011 Jun 2;150(3-4):362-72.
- [232] Fussing V, Wegener HC. **Characterization of bovine *Haemophilus somnus* by biotyping, plasmid profiling, REA-patterns and ribotyping.** Zentralbl Bakteriol. 1993 Jun;279(1):60-74.
- [233] **16S rRNA-Gen basierte Identifizierung von Pathogenen,** Harmsen, Dag; BIO Spektrum, Sonderausgabe11. Jahrgang, 01/2005
- [234] Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P Jr. **How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity.** Int J Syst Bacteriol. 1992 Jan;42(1):166-70.
- [235] do Nascimento NC, Santos AP, Guimaraes AM, Sanmiguel PJ, Messick JB. ***Mycoplasma haemocanis*--the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era.** Vet Res. 2012 Sep 28;43:66. doi: 10.1186/1297-9716-43-66.
- [236] Sandal I, Inzana TJ. **A genomic window into the virulence of *Histophilus somni*.** Trends Microbiol. 2010 Feb;18(2):90-9.
- [237] Hjärre, A., u. G. Wramby (1943): **Om fibrinos serosa-ledinflammation (Glässer) hos svin.** Skand. Vet. -Tidskr. 32, 289
- [238] San Milan A., Escudero J.A., Catalan A.M., Porrero M.C., Dominguez L., Moreno M.A., Gonzales-Zorn B. **Beta-lactam resistance in *Haemophilus parasuis*.** Clinical Microbiology and Infection, Vol. 12, April 2006

A.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie, basierend auf ICSP Subcommittee on the Taxonomy of <i>Pasteurellaceae</i> - December 2009 (Henrik Christensen; http://www.the-icsp.org/taxa/Pasteurellaceaelist.htm)	5
Abbildung 2: Ammen-Phänomen, [IVB Zürich].....	9
Abbildung 3: Gram-Färbung von <i>Haemophilus influenzae</i> [www.k8science.org/hot-topics/images/flu-041028.gif]	37
Abbildung 4: Faktoren-Abhängigkeit von <i>H. influenzae</i> [http://web.indstate.edu/thcme/micro/haemophXV.jpg].....	43
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Typisierungsschemas	48
Abbildung 6: 16S rDNA Polymerase-Ketten-Reaktion	55
Abbildung 7: Dendrogramm der haemophilen Bakterienisolate (Neighbor-Joining Algorithmus)	60
Abbildung 8: Einteilung der <i>H. somni</i> -Isolate zu den Ribotypen A-E	61

A.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Haemophilus/Histophilus</i> Spezies und verursachte Krankheiten	7
Tabelle 2: Faktorenabhängigkeit diverser <i>Haemophilus</i> -Stämme.....	10
Tabelle 3: Verbreitung und klinische Manifestationen von <i>H. influenzae</i> [118].	29
Tabelle 4: Die wichtigsten Studien zur Wirksamkeit der konjugierten Impfstoffe [138]	32
Tabelle 5: Schema für die <i>Haemophilus influenzae</i> -Impfung in Abhängigkeit vom Alter [138]	33
Tabelle 6: Lyophilisate.....	35
Tabelle 7: Reagenzien und Lösungen.....	36
Tabelle 8: Puffer und Reagenzien.....	38
Tabelle 9: Lösungen und Reagenzien, PCR	39
Tabelle 10: PCR-Protokoll.....	40
Tabelle 11: Verwendete Primer.....	40
Tabelle 12: Lösungen und Reagenzien.....	41
Tabelle 13: Testplättchen	42
Tabelle 14: Zusammensetzung pro Liter TSB-Medium.....	44
Tabelle 15: Puffer und Enzyme	44
Tabelle 16: Reagenzien, Materialien (Blot)	45
Tabelle 17: Reagenzien und Puffer zur Hybridisierung.....	46
Tabelle 18: Phänotypische Charakterisierung der haemophilen Bakterienisolate	53
Tabelle 19: Kolonieformen	54
Tabelle 20: 16S rDNA Sequenzanalysen der haemophilen Bakterienisolate	58
Tabelle 21: 16S rDNA Gruppeneinteilung der haemophilen Bakterienisolate.....	59
Tabelle 22: Zuordnung der Isolate zu den fünf identifizierten Ribotypen	61
Tabelle 23: Gegenüberstellung der Typisierungsergebnisse	62
Tabelle 24: Lyophilisate.....	72